

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001 年 10 月 18 日 (18.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/77362 A1

(51) 国際特許分類: C12P 21/02, G01N 33/53, 33/531, 33/543, C07K 16/28, A61K 39/395, C12N 15/12 // 5/10, C12P 21/08

(KINOSHITA, Yasuko) [JP/JP]. 石川雄治 (ISHIKAWA, Yuji) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/02964

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 4 月 5 日 (05.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-105423 2000 年 4 月 6 日 (06.04.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木下 恭子

[続葉有]

(54) Title: IMMUNOASSAY OF ANTI-HM1.24 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗HM1.24抗体の免疫学的測定

(57) Abstract: A process whereby a highly purified soluble HM1.24 antigen protein can be produced at a high efficiency. Namely, a process for producing a soluble HM1.24 antigen extracellular domain characterized by comprising culturing animal cells transformed by an expression vector which contains an (A1)EF1a promoter and a gene encoding soluble HM1.24 antigen lacking the intracellular domain ligated downstream of the promoter, and isolating and purifying the soluble HM1.24 antigen from the culture.

(57) 要約:

本発明は、高度に精製された可溶性HM1.24抗原タンパク質を高い効率で製造することができる方法を提供する。すなわち、本発明は、(A1) EF1  $\alpha$ プロモーターと、その下流に連結された、細胞内ドメインを欠く可溶性HM1.24抗原をコードする遺伝子とを含んで成る発現ベクターにより形質転換された動物細胞を培養し、そして培養物から可溶性HM1.24抗原単離・精製することを特徴とする可溶性HM1.24抗原細胞外ドメインの製造方法を提供する。

WO 01/77362 A1



添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 抗HM1.24抗体の免疫学的測定

## 発明の分野

本発明は、抗HM1.24抗体の免疫化学的測定方法に関する。また本発明は可溶性HM1.24抗原タンパク質の免疫化学的測定方法に関する。さらに本発明は、可溶性HM1.24抗原タンパク質及びそれをコードするDNA に関する。

## 背景技術

Goto, T らはヒト形質細胞を免役して得られた、B 細胞系列に特異的に発現する分子量が22~39 kDaの抗原を認識するマウスモノクローナル抗体1.24抗体を報告している (Blood(1994)84, 1922-1930)。このマウス抗HM1.24抗体はヒト形質細胞を移植したマウスにおいてin vivo 抗腫瘍効果ならびに、ヒト形質細胞に対するADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) 活性によるin vitro抗腫瘍効果を示す (Ozaki, S et al., Blood,(1997)90, 3179-3186)。

また、このマウス抗HM1.24抗体のキメラ抗体および再構成ヒト抗体が作製されている (小野浩一郎ら第20回日本分子生物学会年会(1997)抄録集一般演題3-501-P-478; WO 98/14580)。

一方、これらマウスHM1.24抗体、キメラ抗体、再構成ヒト抗体の活性測定はヒト形質細胞株RPMI8226を用いたcell-ELISA (Goto, T ら、Blood(1994)84, 1922-1930) によって行われており、より精度の高い測定方法が求められていた。

## 発明の開示

抗HM1.24抗体とその抗原である細胞膜上に発現しているHM1.24抗原タンパク質については上述のようにすでに報告されている。しかしながら、高度に精製された可溶性HM1.24抗原の製造方法は知られておらず、従って高度に精製された可溶性HM1.24抗原タンパク質を用いて、低濃度の可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を検出又は測定する方法は知られていなかった。

従って本発明はまず、高度に精製された可溶性HM1.24抗原タンパク質を高い効率で製造することができる方法を提供する。

すなわち、本発明は、(A1) EF1  $\alpha$  プロモーターと、その下流に連結された、細胞内ドメインを欠く可溶性HM1.24抗原をコードする遺伝子とを含んで成る発現ベクターにより形質転換された動物細胞を培養し、そして培養物から可溶性HM1.24抗原単離・精製することを特徴とする可溶性HM1.24抗原細胞外ドメインの製造方法を提供する。

本発明はまた、(A2) 前記可溶性HM1.24抗原が配列番号：5又は16に示すアミノ酸配列を有する、前記の方法を提供する。

本発明はまた、(A3) 前記可溶性HM1.24抗原が配列番号：7又は17に示すアミノ酸配列を有する、前記の方法を提供する。

本発明はまた、(A4) 前記可溶性HM1.24抗原がインフルエンザ凝集素(HA)との融合蛋白質の形である前記の方法を提供する。

本発明はまた、(A5) 前記融合蛋白質が配列番号：10又は18に記載のアミノ酸配列を有する、前記の方法を提供する。

本発明はさらに、(A6) 前記融合蛋白質が配列番号：11又は19に記載のアミノ酸配列を有する、前記の方法を提供する。

本発明はさらに、(A7) 前記動物細胞がCHO細胞である、前記の方法を提供する。

本発明はさらに、（A 8）形質転換された動物細胞が100 nmol/Lの濃度のメトトレキセート（MTX）の存在下に遺伝子増幅を行ったものである、前記の方法を提供する。

本発明はさらに、高度に精製された可溶性HM1.24抗原タンパク質を用いて抗HM1.24抗体を検出又は測定する簡便な方法を提供する。

すなわち、本発明は、（B 1）可溶性HM1.24抗原タンパク質と被験試料中に含まれる抗HM1.24抗体とを反応させて、可溶性HM1.24抗原タンパク質に結合した抗HM1.24抗体を検出又は測定する工程を含む、抗HM1.24抗体の免疫化学的測定方法を提供する。可溶性HM1.24抗原タンパク質は、好ましくは他のペプチド又はポリペプチドと融合している。可溶性HM1.24抗原タンパク質は、好ましくは支持体と結合している。

支持体は、好ましくはビーズ又はプレートである。可溶性HM1.24抗原タンパク質は、好ましくは可溶性HM1.24抗原タンパク質又は可溶性HM1.24抗原タンパク質と融合した他のペプチド又はポリペプチドに対する抗体により支持体と結合している。

本発明はまた、（B 2）可溶性HM1.24抗原タンパク質に結合した抗HM1.24抗体を、抗HM1.24抗体に対する一次抗体により検出又は測定することを特徴とする前記（B 1）に記載の免疫化学的測定方法を提供する。

本発明はまた、（B 3）可溶性HM1.24抗原タンパク質に結合した抗HM1.24抗体を、抗HM1.24抗体に対する一次抗体及び一次抗体に対する二次抗体により検出又は測定することを特徴とする前記（B 1）又は（B 2）に記載の免疫化学的測定方法を提供する。前記（B 1）又は（B 2）において、一次抗体又は二次抗体は、好ましくは放射性同位元素、酵素、ビオチン／アビジン又は蛍光物質により標識されている。

本発明はまた、(B 4) 抗HM1.24抗体に結合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を、可溶性HM1.24抗原タンパク質に対する一次抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質と融合した他のペプチド又はポリペプチドに対する一次抗体により検出又は測定することを特徴とする前記(1)～(3)に記載の免疫化学的測定方法を提供する。

本発明はまた、(B 5) 抗HM1.24抗体に結合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を、可溶性HM1.24抗原タンパク質に対する一次抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質と融合した他のペプチド又はポリペプチドに対する一次抗体及び一次抗体に対する二次抗体により検出又は測定することを特徴とする前記(B 1)～(B 4)に記載の免疫化学的測定方法を提供する。前記(B 1)～(B 4)において、一次抗体又は二次抗体は、好ましくは放射性同位元素、酵素、ビオチン／アビジン又は蛍光物質により標識されている。

#### 図面の簡単な説明

図1は、HAタグ付加可溶性抗原を用いたsandwich ELISA系を示す模式図である。

図2は作製したHAタグ付加可溶性HM1.24抗原産生細胞株が培養上清中に産生している可溶性抗原の量を比較した図である。希釈倍率が高い方が高産生である。

図3はHAタグ付加可溶性HM1.24抗原産生細胞4株(164-2-1, 164-2-13, 164-2-17、及び164-2-31)の培養上清中を還元状態にてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、マウス抗HM1.24抗体によるwestern blotを行い、HM1.24抗原を検出した結果を示す図面代用写真である。

図4は750倍から3倍希釈で5段階希釈した精製抗原を用いたサンドイッチELISA系におけるヒト型化抗HM1.24抗体の標準曲線を示

すグラフである。

図 5 は精製抗原を 5000 倍希釈（約 76.4 ng/mL）で用いたサンドイッチ ELISA 系におけるヒト型化抗 HM1.24 抗体の標準曲線を示すグラフである。

図 6 は、HM1.24 抗原タンパク質をコードする cDNA の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を示す図である。

図 7 は、HM1.24 抗原タンパク質をコードする cDNA の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を示す図である。

図 8 は、Panning 法を用いて単離したクローン P3.19 及び免疫スクリーニング法により単離された 5 つのクローン（IS1 ～ IS5）の模式図である。

図 9 は、抗 HM1.24 抗体（A ; CHO/NEO, B ; CHO/HM）を用いたフローサイトメトリー解析の結果を示す図である。抗 HM1.24 抗体のヒストグラムは実線で、アイソタイプの一一致したコントロール抗体（UPC10）のヒストグラムは波線で示す。なお、横軸は蛍光強度を、縦軸は細胞数を示す。

図 10 は、各種細胞株および HM1.24 発現 CHO 細胞における HM1.24 抗原の発現を抗 HM1.24 抗体を用いた免疫沈降・ウエスタンブロッティング法により検出した結果を示す図面代用写真である。抗 HM1.24 抗体結合セファロース 4B（レーン 1 ～ 6）または非結合セファロース 4B（レーン 7 及び 8）を用いて免疫沈降を行った後、抗 HM1.24 抗体を用いてウエスタン・ブロッティングを行い、HM1.24 抗原の検出を行った（右側に表示）。（\* ; 抗 HM1.24 抗体 H 鎖）

## 発明の実施の形態

本発明の可溶性 HM1.24 抗原タンパク質としては、配列番号 : 5 示すアミノ酸配列においてアミノ酸位置 1 位の Asn からアミノ酸位置

132 位のGln からなるアミノ酸配列を有し、且つ可溶性HM1.24抗原タンパク質の生物学的活性を有するタンパク質であれば、いかなるものであってもよい。可溶性HM1.24抗原タンパク質の生物学的活性とは、抗HM1.24抗体に特異的に結合され、細胞膜には結合しておらず細胞膜から遊離して可溶性であり、且つ二量体である。

また、本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質は、可溶性HM1.24抗原タンパク質の生物学的活性を有し、且つ配列番号：5に示すアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び/又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原タンパク質であってよい。本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質は、より具体的には可溶性HM1.24抗原タンパク質の生物学的活性を有する限り、配列番号：5に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1又は24個以下、より好ましくは1又は12個以下のアミノ酸残基が置換したアミノ酸を有してよい。

又は、配列番号：5に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1又は42個以下、より好ましくは1又は17個以下のアミノ酸残基が欠失したアミノ酸を有してよい。又は、配列番号：5に示すアミノ酸配列において、1又は2個以上、好ましくは1又は50個以下、より好ましくは1又は14個以下のアミノ酸残基が付加したアミノ酸を有してよい。本発明に使用される可溶性HM1.24抗原タンパク質はまた、上記アミノ酸の置換、欠失及び/又は付加による修飾が同時になされていてもよい。

可溶性HM1.24抗原タンパク質は、配列番号：5において1位のアミノ酸Asn から90位のアミノ酸Arg までのアミノ酸配列を有していればその生物学的活性を示すことが明らかになっている。したがって、本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質は、配列番号：5において1位のアミノ酸Asn から90位のアミノ酸Arg までのアミノ酸配



列を有するか、あるいは1 位のアミノ酸Asn から90 位のアミノ酸Arg までのアミノ酸配列に対する1 又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原タンパク質であってよい。

可溶性HM1.24抗原タンパク質は、その生物学的活性有する限り、配列番号：5 において90 位のアミノ酸Arg から132 位のアミノ酸Gln までのアミノ酸配列を有するか、あるいはこのアミノ酸配列に対して1 又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原タンパク質であってよい。

配列番号：5 に示すアミノ酸配列に対する1 又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原タンパク質として、配列番号：7 又は17、10又は18、あるいは11又は19に示されるアミノ酸配列を有する可溶性HM1.24抗原タンパク質が挙げられる。

あるアミノ酸配列に対する1 又は複数個のアミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質は、由来する種、それらを産生する宿主及び／又は精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点、糖鎖付加の有無や糖鎖付加の位置、糖鎖の構造、リン酸化状態及び／又はジスルフィド結合の有無が異なる。しかしながら、

本発明に好適に使用し得る限り、いかなる構造を有するタンパク質であってよい。タンパク質が由来する種としてはヒトが好ましい。

本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：5に示す塩基配列の塩基位置1位の塩基アデニンから396位の塩基グアニンからなる塩基配列が挙げられる。また、本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質をコードするDNAとしては配列番号：5に示す塩基配列を有するDNAであれば、いかなる由来のDNAであってよい。このようなDNAとして、例えばジェノミックDNA、cDNA、合成DNAが挙げられる。これらは、種々の細胞、組織又は臓器あるいはヒト以外の種から得られたcDNAライブラリー、ジェノミックライブラリーから得られたDNAであってよいし、それらは市販のDNAライブラリーであってもよい。これらライブラリーに用いられるベクターとしては、プラスミド、バクテリオファージ、YACベクター等いかなるものであってもよい。

本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質をコードするDNAとしてはまた、配列番号：5に示す塩基配列に対しハイブリダイズし、且つ可溶性HM1.24抗原タンパク質の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするDNAであってもよい。可溶性HM1.24抗原タンパク質をコードするDNAがハイブリダイズする条件としては、適度なストリンジェンシー条件下においてハイブリダイズするDNAが挙げられる。

このようなハイブリダイズ条件としては、例えば低ストリンジェンシーな条件が挙げられる。低ストリンジェンシーな条件としては、例えば42℃、5×SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、50%ホルムアミドにより与えられる洗浄条件である。より好ましくは、高ストリンジェンシーな条件が挙げられる。高ストリンジェンシーな条件としては、例えば60℃、0.1×SSC、0.1%ドデシル硫酸ナトリ

ウムにより与えられる洗浄条件である。あるタンパク質をコードする塩基配列に対し、適度な条件でハイブリダイズするDNA がコードするタンパク質がそのタンパク質と同じ生物学的活性を有することはすでに知られている。

従って、本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質は、上記の「ハイブリダイズするDNA」によりコードされており、可溶性HM1.24抗原タンパク質の生物活性を有するタンパク質も包含する。

なお、細胞膜上に発現するヒトHM1.24抗原タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：15又は23に示す。配列番号：15又は23のアミノ酸配列を有するヒトタンパク質をコードするDNA をpUC ベクターのXbaI切断部位間に保持するプラスミドpRS38-pUC19 を含有する大腸菌は*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pRS38-pUC19) と命名され、平成5 (1993) 年10月5日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に寄託番号FERM BP-4434として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明の可溶性HM1.24抗原タンパク質はまた、可溶性HM1.24抗原タンパク質の生物学的活性を有する限り他のペプチド又はポリペプチドと融合した上記タンパク質であってよい。これら融合タンパク質を作製する方法は、すでに公知の手法を用いることができる。タンパク質との融合に付される他のペプチド又はポリペプチドとしては、本発明に有効に使用される限りいかなるペプチド又はポリペプチドであってよい。

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., *BioTechnology* (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6 $\times$ His、10 $\times$ His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag

、Protein C の断片等、すでに公知であるペプチドが使用される。

また例えば、ポリペプチドとしては、GST（グルタチオン・S・トランスフェラーゼ）、HA、イムノグロブリン定常領域、b-ガラクトシダーゼ、MBP（マルトース結合蛋白質）等が挙げられる。これらは市販されているものを用いることができる。

本発明のタンパク質をコードするDNAは、以上に述べたDNAを市販のキットや公知の方法によって構築することができる。例えば、制限酵素による消化、リンカーの付加、開始コドン（ATG）及び／又は終始コドン（ATT、TGA又はTAG）の挿入等により構築することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウィルス由来の発現ベクター、例えばpHSV、pMV、酵母由来の発現ベクター、例えばpNV11、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpGEX、pGEMEX、pMALp2が挙げられる。

本発明のタンパク質の発現ベクターには、例えば可溶性HM1.24抗原タンパク質をコードするDNAをプロモーターの下流に連結し、これを発現ベクターに導入することにより製造することができる。プロモーター／エンハンサーとしては、哺乳動物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばEF1- $\alpha$ プロモーター／エンハンサー、 $\gamma$ -アクチンプロモーター／エンハンサー、昆虫ウィルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えば多核体（ポリヘドリン）ウィルスプロモーター／エンハンサー、植物由来のプロモーター／エンハンサー、例えばタバコモザイクウィルスプロモーター／エンハンサー、

動物ウィルス由来のプロモーター／エンハンサー、例えばSV40プロモーター／エンハンサー、ヒトCMV プロモーター／エンハンサー、酵母由来のプロモーター／エンハンサー、例えばアルコール脱水素酵素プロモーター／エンハンサー、大腸菌由来のプロモーター／エンハンサー、例えばLac プロモーター／エンハンサー、Trp プロモーター／エンハンサー、Tac プロモーター／エンハンサーが挙げられる。

本発明のタンパク質の発現には、発現に用いられる宿主に適したシグナル配列を付加して使用してもよい。シグナル配列としては、例えば分泌蛋白質のシグナル配列が挙げられる。分泌蛋白質のシグナル配列としては、例えば哺乳動物由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばイムノグロブリンのシグナル配列が挙げられる。また分泌蛋白質のシグナル配列としては、大腸菌由来分泌蛋白質のシグナル配列、例えばOmpA等のペリプラズム分泌シグナル配列が挙げられる。

このように作製した発現ベクターは、公知の方法により宿主に導入することができる。宿主への導入の方法としては、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム法、リポソーム法が挙げられる。

本発明に使用されるタンパク質は、上述のように遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換えタンパク質として得ることができる。例えば、組換えタンパク質は、本明細書に記載された遺伝子の塩基配列をそれらを発現する細胞、組織、又は臓器からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明には、この組換えタンパク質を用いることができる。

具体的には、本発明に使用されるタンパク質を発現する細胞、組織、又は臓器から、その遺伝子をコードするmRNAを単離する。mRNA

の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて遺伝子のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、cDNAの合成及び増幅を行うにはMarathon cDNA Amplification kit (CLONTECH製)及びポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)を使用することができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。目的とするDNAが得られれば、これを発現ベクターへ組み込む。より具体的には、前記のように構築したDNAは、下記のように発現させ、タンパク質を取得することができる。

哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、発現される遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現さ

せることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他にタンパク質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーシヨンファクター1  $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、タンパク質分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いること

ができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明において、タンパク質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitro 及び in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば sf9、sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギウス・ニガー (Aspergillus niger) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌



細胞としては、大腸菌 (E. coli) 、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞をin vitroで培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、in vivoの産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993) 。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とするDNAをヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁からタンパク質を得る。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702) 。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的とするDNA を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望のタンパク質を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNA を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のタンパク質を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

なお、宿主への発現ベクターの導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) 等が用いられる。また、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, r43-r74)。

これらの動物又は植物に上記のように遺伝子を導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。前記のように発現、産生されたタンパク質は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用されるタンパク質の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせ

れば、タンパク質を分離、精製することができる（新生化学実験講座1（1990）東京化学同人）。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

タンパク質は、公知の方法を用いて濃度を測定することができる。例えば、吸光度の測定又はBradford法を用いればよい。

本発明は、可溶性HM1.24抗原タンパク質と被験試料中に含まれる抗HM1.24抗体とを反応させて、可溶性HM1.24抗原タンパク質に結合した抗HM1.24抗体を検出又は測定する工程を含む、抗HM1.24抗体の免疫化学的測定方法；及び

抗HM1.24抗体と被験試料中に含まれる可溶性HM1.24抗原タンパク質とを反応させて、抗HM1.24抗体に結合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を検出又は測定する工程を含む、可溶性HM1.24抗原タンパク質の免疫化学的測定方法に関する。

本発明において提供される免疫化学的測定方法は、*in vitro*のアッセイ系として行われる。この方法の1例を図1に模式的に示す。

*in vitro* のアッセイ系は、非細胞系において行われる。具体的には可溶性HM1.24抗原タンパク質を支持体に結合させ、このタンパク質に抗HM1.24抗体を含む被験試料を加え、インキュベートをした後洗浄して支持体に結合した可溶性HM1.24抗原タンパク質に対する抗HM1.24抗体の結合を検出又は測定すればよい。又は、具体的には

抗HM1.24抗体を支持体に結合させ、このタンパク質に可溶性HM1.24抗原タンパク質を含む被験試料を加え、インキュベートをした後洗浄して支持体に結合した抗HM1.24抗体に対する可溶性HM1.24抗原タンパク質の結合を検出又は測定すればよい。

可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体は、それらを固有に発現する細胞、それらをコードするDNAを導入した細胞、それらをコードするDNAを導入した動物又は植物から産生されるタンパク質を、精製した状態であるいは粗精製の状態で使用することができる。

精製された又は粗精製された可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体のいずれか一方のタンパク質を支持体に結合させる。タンパク質を支持体に結合させる際に標準的な方法でタンパク質を支持体に固相化することができる。タンパク質を結合させる支持体としては、例えば不溶性の多糖類、例えばアガロース、デキストラン、セルロース、合成樹脂、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等が挙げられる。

より具体的にはそれらを原料として製造される市販のビーズ、プレートが用いられる。ビーズの場合、これらが充填されたカラム等を用いてもよい。プレートの場合、マルチウェルプレート（96穴マルチウェルプレート等）やバイオセンサーチップが挙げられる。

タンパク質と支持体との結合は、化学結合、物理的な吸着等、通常用いられる方法により結合すればよい。また、タンパク質を特異的に認識する抗体を上述の方法により予め支持体に結合せしめ、この抗体とタンパク質とを結合させることにより結合することもできる。さらに、アビジン／ビオチンを介して結合させることができる。

可溶性HM1.24抗原タンパク質と抗HM1.24抗体の結合は、通常緩衝

液中で行われる。緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、Tris緩衝液等が使用される。また、インキュベートの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば4℃～室温にて1時間～24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、可溶性HM1.24抗原タンパク質と抗HM1.24抗体との結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば界面活性剤を含む緩衝液が使用される。界面活性剤としては、例えば0.05%Tween 20 が使用される。

本発明において測定される可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を含む被験試料としては、ヒト体液（血液、血清、尿、関節液等）、細胞の培養上清、動物の分泌物（乳等）、医薬製剤等をあげることができる。

これらの被験試料に含まれる可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体に対する抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質の結合を検出又は測定する際、適切な条件下でインキュベート及び洗浄することにより、特異的な結合と非特異的な結合を分離することができる。そして、可溶性HM1.24抗原タンパク質と抗HM1.24抗体との結合状態を評価すればよい。

本発明の免疫化学的測定方法において、被験試料をタンパク質に接触させる群と共にコントロール群を設置してもよい。コントロール群としては、被験試料を含まない陰性コントロール群又は精製された可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体の標品を含む陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。

本発明の免疫化学的測定方法により、結合したタンパク質を検出することができる。又は結合したタンパク質を定量的に測定することもできる。これらの場合、被験試料を含まない陰性コントロール群で得られた結果、被験試料を含む群で得られた結果及び／又は精製された可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体の標品を含

む陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、可溶性HM1.24抗原タンパク質と抗HM1.24抗体との結合を検出することができる。

また、それらの検出の結果を数値として得、それらの数値を比較することにより、被験試料に含まれる可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を定量的に測定することもできる。定量的に測定する場合、被験試料を含まない陰性コントロール群で得られた数値と可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を含む被験試料を適用した群で得られた数値を比較することにより、可溶性HM1.24抗原タンパク質と抗HM1.24抗体との結合量を定量することができる。被験試料中に可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体が含まれていれば、結合したタンパク質が存在することにより可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を検出又は測定することができる。

また、定量的に測定する場合、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を既知量含む陽性コントロール群で得られた数値により作成された標準曲線を元に定量することができる。

本発明の免疫化学的測定方法において、被験試料中の可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することができる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーはタンパク質—タンパク質間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore ; Pharmacia 製）。したがって、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることにより可溶性HM1.24抗原タンパク質と抗HM1.24抗体との結合を検出又は測定することが可能である。

具体的には、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を固定化したセンサーチップに、抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質を含む被験試料を接触させ、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体に結合する抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質を共鳴シグナルの変化として検出又は測定することができる。

より具体的には、以下のように行えばよい。初めにセンサーチップCM5（Biosensor社）を活性化して可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体をセンサーチップ上に固定化する。すなわち、EDC / NHS 水溶液（200mM EDC（N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル）カーボネート塩酸塩），50mM NHS（N-ヒドロキシサクシニミド））によりセンサーチップを活性化した後、HBSバッファ（10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA, 0.05%Tween20）によりセンサーチップを洗浄する。

次に HBSバッファに溶解した適量の抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質を含む被験試料をセンサーチップに接触させ、固定化する。HBSバッファによりセンサーチップを洗浄後、エタノールアミン溶液（1M エタノールアミン塩酸塩，pH8.5）によりセンサーチップ上の残存活性基をブロックする。再び HBSバッファによりセンサーチップを洗浄し結合評価に用いる。

次にHBS バッファに溶解した適量の抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質を含む被験試料を注入する。このときにセンサーチップに固定化された可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体に結合した被験試料中の抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質の量は共鳴シグナル値の増加として観察される。

さらに、また被験試料を含む群と共に、コントロール群を設置してもよい。コントロール群としては、被験試料を含まない陰性コン

コントロール群、既知量の可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を含む陽性コントロール群あるいはその両群をおくことができる。結合したタンパク質は共鳴シグナル値の変化量として定量的に測定することができる。この場合、被験試料を含まない陰性コントロール群で得られた結果、被験試料を含む群で得られた結果及び／又は既知量の可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を含む陽性コントロール群で得られた結果を比較することにより、被験試料中の目的とするタンパク質を検出又は測定することができる。

本発明の免疫化学的測定方法において、結合した被験試料中のタンパク質を検出又は測定する手段として、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を特異的に認識する一次抗体を用いることができる。

例えば、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体に被験試料を接触させ、洗浄して結合しているタンパク質をそのタンパク質を特異的に認識する一次抗体により検出又は測定する。すなわち、好ましくは支持体に結合させた一方のタンパク質にもう一方のタンパク質を含む被験試料とを接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合しているタンパク質をそのタンパク質を特異的に認識する一次抗体により検出又は測定すればよい。一次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。

可溶性HM1.24抗原タンパク質は、他のペプチド又はポリペプチドと融合していてもよい。したがって、被験試料中に含まれる可溶性HM1.24抗原タンパク質を検出するために抗HM1.24抗体を使用することができるし、可溶性HM1.24抗原タンパク質と融合した他のペプチド又はポリペプチドに対する抗体を使用することができる。また、被験試料中に含まれる抗HM1.24抗体を検出するために抗HM1.24抗体を特異的に認識する抗体を使用することができる。抗HM1.24抗体が



マウス抗体である場合、抗HM1.24抗体を特異的に認識する抗体として抗マウスイムノグロブリン抗体を使用することができる。また、抗HM1.24抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である場合、抗HM1.24抗体を特異的に認識する抗体として抗ヒトイムノグロブリン抗体を使用することができる。

タンパク質は、通常知られる方法により標識されることができる。標識物質としては、例えば放射性同位元素、酵素、蛍光物質、ビオチン／アビジン等が挙げられる。これらの標識物質は市販の標識物質を使用することができる。放射性同位元素としては、例えば $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ が挙げられる。酵素としては、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペーオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ等が挙げられる。蛍光物質としては、例えばフロオロセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンが挙げられる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を含む溶液をプレートに加え、一夜放置してプレートに固定する。可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を固定する際、各々に対する抗体をあらかじめプレートに固定し、固定した抗体に可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を結合させてもよい。プレートを洗浄の後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSAでブロッキングする。再び洗浄し、抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質を含む被験試料をプレートに加える。同時に被験試料を含まない群（陰性コントロール）及び／又は既知濃度の抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質を加えた群（陽性コントロール）を置き、これらをインキュベートする。

インキュベートの後、洗浄し被験試料に対する抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレート洗浄しそのタンパク質を特異的に認識する一次抗体によりタンパク質を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計より検出又は測定する。これらの結果を、コントロール群で得られた数値を比較すれば阻害物質を含む被験試料を決定することができる。

本発明の免疫化学的測定方法において、被験試料中の可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を検出又は測定する手段として、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体を用いることができる。

例えば、前述の免疫化学的測定方法において、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体に被験試料を接触させ、インキュベートした後、洗浄して結合しているタンパク質をそのタンパク質を特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体により検出又は測定する。すなわち、具体的には可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を支持体に固定し、被験試料を接触させる。インキュベートした後、洗浄して、結合しているタンパク質をそのタンパク質を特異的に認識する一次抗体及び一次抗体を特異的に認識する二次抗体により検出又は測定すればよい。二次抗体は、好ましくは標識物質により標識されている。抗体は、通常知られる上述の方法により標識されることができる。

具体的には、次のようにして行うことができる。すなわち、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を含む溶液をプレートに

加え、一夜放置してプレートに固定する。プレートに固定する際、あらかじめ可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体に対する抗体をプレートに固定し、固定された抗体に可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を結合させてもよい。プレートを洗浄の後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため例えばBSA でブロッキングする。再び洗浄し、被験試料をプレートに加える。同時に被験試料を含まない群（陰性コントロール）及び及び／又は既知濃度の抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質を加えた群（陽性コントロール）を置き、これらをインキュベートする。

インキュベートの後、洗浄し被験試料に含まれる抗HM1.24抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質に対する一次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、次いで一次抗体を特異的に認識する二次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、洗浄して、その被験試料中に含まれるタンパク質を特異的に認識する一次抗体を特異的に認識する二次抗体によりタンパク質を検出又は測定する。検出又は測定には、放射性同位元素の場合液体シンチレーションにより検出又は測定する。酵素の場合その基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出又は測定する。蛍光物質の場合蛍光光度計により検出又は測定する。

これらの結果を、コントロール群で得られた数値を比較すれば阻害物質を含む被験試料を決定することができる。可溶性HM1.24抗原タンパク質は、他のペプチド又はポリペプチドと融合していてもよい。したがって、被験試料中に含まれる可溶性HM1.24抗原タンパク質を検出するための一時抗体として抗HM1.24抗体を使用することができるし、可溶性HM1.24抗原タンパク質と融合した他のペプチド又はポリペプチドに対する抗体を使用することもできる。また、被験試料中に含まれる抗HM1.24抗体を検出するために抗HM1.24抗体を特

異的に認識する抗体を使用することができる。

抗HM1.24抗体がマウス抗体である場合、抗HM1.24抗体を特異的に認識する一次抗体として抗マウスイムノグロブリン抗体を使用することができる。また、抗HM1.24抗体がキメラ抗体又はヒト型化抗体である場合、抗HM1.24抗体を特異的に認識する一次抗体として抗ヒトイムノグロブリン抗体を使用することができる。また、二次抗体として、一次抗体を特異的に認識する抗体を適宜選択することができる。例えば、一次抗体がヒツジ抗体である場合、抗ヒツジイムノグロブリン抗体を使用することができる。また、一次抗体がウサギ抗体である場合、抗ウサギイムノグロブリン抗体を使用することができる。

より詳しくは、本発明は特に好ましくはELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) により次のようにして行うことができる。すなわち、可溶性HM1.24抗原タンパク質と融合されたHA (インフルエンザ凝集素) に対する抗体を固相化バッファー (0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ 、0.02%  $\text{NaN}_3$ 、pH9.6) により希釈する。96穴のイムノプレート (Nunc製) の各穴に希釈したこの水溶液を適量加え、4℃で一晩インキュベートして固相化する。

洗浄バッファー (PBS に0.05% Tween20 となるよう調製したもの) で3回各穴を洗浄後、PBSに溶解した5% BSA (SIGMA 製) 溶液200  $\mu\text{l}$  を加え、室温で2時間ブロッキングする。

次に洗浄バッファーで3回各穴を洗浄し、希釈バッファー (1% BSA、0.5% Tween20、PBS) で希釈したHAと融合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を加え4℃で一晩インキュベートして抗HA抗体とHAと融合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を結合させる。洗浄バッファーで3回洗浄した後、ヒトIgG 抗体定常領域 (C 領域) を有するキメラ抗HM1.24抗体を含む被験試料を一定量加え、室温で1時間イン

キュベートする。

洗浄バッファーで各穴を3回洗浄し、希釈バッファーで5000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体（IBI製）を100 $\mu$ l各穴に加え、室温で1時間インキュベートする。洗浄バッファーで5回各穴を洗浄し、発色溶液（基質バッファー；50 mM NaHCO<sub>3</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>、pH9.8に1 mg/mlの濃度に溶解したSigma 104）を100 $\mu$ l各穴に加え、室温で反応させた後に405 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー（Model 3550、BIO-RAD製）を用いて測定する。これらの結果を陰性コントロール群及び／又は陽性コントロール群で得られた数値を比較することにより、キメラ抗HM1.24抗体を検出又は測定することができる。また、同様の方法により、可溶性HM1.24抗原タンパク質を検出又は測定することも可能である。

本発明のスクリーニング方法は、High Throughput Screening（HTS）にも使用することができる。具体的には、ブロッキングまでを手作業で行い、その後の反応はロボットによって行うことでオートメーション化し、High Throughput screeningを実現することができる。

すなわち、HAに対する抗体を固相化バッファー（0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.02 % NaN<sub>3</sub>、pH9.6）により希釈する。96穴のイムノプレート（Nunc製）の各穴に希釈したこの水溶液を適量加え4℃で一晩インキュベートして固相化する。

洗浄バッファー（PBSに0.05% Tween20となるよう調製したもの）で3回各穴を洗浄後、PBSに溶解した5% BSA（SIGMA製）溶液200 $\mu$ lを加え、室温で2時間ブロッキングする。次に洗浄バッファーで3回各穴を洗浄し、希釈バッファー（1% BSA、0.5% Tween20、PBS）で希釈したHAと融合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を加え

4℃で一晩インキュベートして抗HA抗体とHAと融合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を結合させる。

次いで、例えばBiomek2000 HTS system(Beckman 製)にこのイムノプレートセットして、キメラ抗HM1.24抗体を含む被験試料、キメラ抗HM1.24抗体に対する一次抗体及び一次抗体に対する二次抗体を添加するようにシステムのコントロールプログラムを実行する。

この際、分注機としてはBiomek 2000 分注機(Beckman製)あるいはMultipipette96穴同時分注器(Sagian 製)を用いることでイムノプレート各穴への溶液の分注や溶液の除去を行うことができる。また、イムノプレートの各穴の洗浄にはEL404 マイクロプレートウォッシャー(Bio Tek社)を用いることができる。また、吸光度の測定にはSPECTRAmax250 プレートリーダー(Molecular Devices製)を用いることができる。

プログラムは以下の操作を行うよう設定する。すなわち洗浄バッファで3回各穴を洗浄し、被験試料と希釈バッファ(1% BSA、0.5% Tween20、PBS)で希釈したキメラ抗HM1.24抗体を含む被験試料を一定量加える。同時に被験試料を含まない群(陰性コントロール)及び既知濃度のキメラ抗HM1.24抗体を加えた群(陽性コントロール)を置き、これらを室温で1時間インキュベートする。洗浄バッファで各穴を3回洗浄し、希釈バッファで5000倍に希釈したウサギ抗ヒトIgG 抗血清(New England Biolabs 製)を100  $\mu$ l 各穴に加え、室温で1時間インキュベートする。洗浄バッファで各穴を3回洗浄し、希釈バッファで5000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG 抗体(TAGO製)を100  $\mu$ l 各穴に加え、室温で1時間インキュベートする。

洗浄バッファで5回各穴を洗浄し、発色溶液(基質バッファ; 50 mM NaHCO<sub>3</sub>、10 mM MgCl<sub>2</sub>、pH9.8に1mg/mlの濃度に溶解

したp-ニトロフェニルフォスフェート（Sigma 製））を 100  $\mu$  l 各穴に加え、室温で反応させた後に 405 nm での吸光度をマイクロプレートリーダー、Biomekプレートリーダー（Beckman / Molecular Devices 製）を用いて測定する。これらの結果をコントロール群で得られた数値と比較することにより、被験試料に含まれているキメラ抗HM1.24抗体を検出又は測定することができる。また、同様の方法により、可溶性HM1.24抗原タンパク質を検出又は測定することも可能である。

本発明により提供される免疫化学的測定方法は、可溶性HM1.24抗原タンパク質又は抗HM1.24抗体を500pg/mlの濃度まで測定することが可能である。

本発明に使用される抗体は、市販の抗体や市販のキットに含まれる抗体を用いることもできるし、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体として得ることができる。

モノクローナル抗体は、所望の感作抗原を使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

例えば、抗体取得の感作抗原は、その由来となる動物種に制限されないが、実際に本発明で使用するペプチド又はポリペプチドの由来となる哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のものが好ましい。これらのうち、特にヒト由来の感作抗原が好ましい。例えば、ヒト可溶性HM1.24抗原タンパク質を感作抗原として使用する場合、それらの塩基配列及びアミノ酸配列は本明細書に開示される遺

伝子配列を用いて得ることができる。また、可溶性HM1.24抗原タンパク質との融合に付される他のペプチドやポリペプチドを感作抗原として用いる場合、それらのペプチドやポリペプチドを化学的に合成するか、遺伝子工学的手法により得ることができる。

感作抗原として使用されるタンパク質、ペプチド又はポリペプチドは、その全長を使用してもよいし、またその断片も用いることができる。断片としては、例えばC末端断片やN末端断片が挙げられる。あるいは、感作抗原として使用されるタンパク質、ペプチド又はポリペプチドを発現する細胞を感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をP B S (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4～21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の



抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、ポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653)(Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8.U1 (Yelton, D. E. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、F0 (de St. Groth, S. F. and Scheidegger, D., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができ

る。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、センダイウィルス（HVJ）等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を通常、30～60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及びクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得

る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウィルスに感染したヒトリンパ球をin vitroでペプチド又はポリペプチドやそれらの発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、ペプチド又はポリペプチドへの結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688）。

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるペプチド又はポリペプチド、それらの発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて本発明に使用されるペプチド又はポリペプチドに対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735及びW096-34096参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる。例え

ば、組換え型抗体は、抗体遺伝子をハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明には、この組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。

本発明で使用する抗体は、所望の結合活性を有するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。本発明には、公知の技術により作製されるキメラ抗体又はヒト型化抗体を使用することができる。

また、本発明の免疫化学的測定方法により検出又は測定される抗体は、上述の抗体、例えばハイブリドーマに産生される抗体、組換え型抗体、キメラ抗体及びヒト型化抗体のいずれでもよい。

前記のように発現、産生された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分

離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

上記で得られた抗体の濃度測定又は活性確認は、公知の方法、例えばELISA、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。

抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマHM1.24は、工業技術院生命工学工業研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成7 (1995) 年9月14日にFERM BP-5233としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

本発明の別の態様は、被験試料中に含まれる抗HM1.24抗体の抗原結合活性を測定し、これをもって抗HM1.24抗体の品質を管理する方法である。抗体を有効成分として含有する医薬品においては、単に、抗体の量のみならず、抗体の生物活性が適切に保持されていることが重要である。抗体の生物活性は多くの場合、抗原との結合活性であり、抗原との結合活性を保持する抗体が、医薬組成物中においてどの程度であるかを確認することは、高体を有効成分として含有する医薬品の品質管理として必須である。本発明の方法は、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する医薬品の品質を適切に管理する方法、及び品質を適切に管理された抗HM1.24抗体、ならびに抗HM1.24抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。

医薬品の製造工程においては、医薬品または医薬組成物の品質を管理することが必要である。従って、適節な品質管理方法は医薬品または医薬組成物の製造工程の一部である。本発明の方法は、適切な品質管理方法を提供することによって、抗HM1.24抗体の製造方法ならびに、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する医薬組成物の製造方法を提供するものである。

#### 実施例

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、本発明の範囲を限定するものではない。

##### 実施例 1. 可溶性ヒトHM1.24抗原用発現プラスミドの構築

EcoRI（宝酒造社製）およびNotI（宝酒造社製）で消化することにより調製したEF1  $\alpha$ プロモーターを含むHEF発現ベクター（国際特許出願公開番号W092-19759）と、Igリーダー配列とHAタグをコードする遺伝子ペア（Amersham Pharmacia社製）を、50 mmol/L Tris-HCl、pH7.6、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mmol/L ジチオスレイトール、1 mmol/L ATP、50 mg/mLのポリエチレングリコールおよび10ユニッ

トT4 DNAリガーゼ (TOYOBO社製) を含有する反応混合物中で、16℃にて3時間反応させ連結した。

挿入したIgリーダー配列とHAタグをコードする遺伝子として、EcoRI、KpnI (宝酒造社製) およびNotI制限酵素認識部位をリンカーとして接続した配列番号1及び2に示す合成遺伝子ペアを用いた。次に連結反応混合物を大腸菌 DH5 $\alpha$  のコンピテント細胞 (GIBCO-BRL 社製) に加え、これを氷上で30分間、42℃にて1分間、そして再び氷上で1分間静置した。

次いで、400  $\mu$ L のSOC 培地 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) ) を加え、37℃にて1時間インキュベーションした後、50  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含有するLB寒天培地 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) ) 上にこの大腸菌を播き、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この大腸菌形質転換体を 50  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含有するLB培地中で37℃にて一夜培養し、この培養物から、アルカリ法 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) ) に従ってプラスミドDNAを調製した。

一方、HM1.24抗原の細胞外領域の遺伝子はThermal Cycler (Perkin Elmer Cetus社製) を用いたPCR 法により増幅した。HM1.24抗原のcDNA (配列番号15) を鋳型として、100 pmolの配列番号3及び4に示したプライマー、10 mmol/L Tris-HCl、pH8.3、50 mmol/L KCl、0.1 mmol/L dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> および5ユニットのDNAポリメラーゼAmpli Taq (Perkin Elmer Cetus社製) を含有する混合物を最初に94℃にて最初の変性の後

、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを30回行い、最後に72℃にて10分間インキュベーションした。

このPCR産物をHM1.24抗原の細胞外領域（配列番号5）の遺伝子として、KpnIおよびBamHI消化した上記プラスミドDNAと50 mmol/L Tris-HCl、pH7.6、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトール、1 mmol/L ATP、50 mg/mLのポリエチレングリコールおよび1ユニットT4 DNAリガーゼ（TOYOBO社製）を含有する反応混合物中で、16℃にて3時間反応させ連結した。上記同様に、連結反応混合物を大腸菌 DH5α のコンピテント細胞に加え、大腸菌形質転換体を得、これよりプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAをHAタグ付加可溶性抗原発現プラスミド、psHMとした。

また、配列番号3及び6に示したプライマーを用い、同様にしてC端も削除したHM1.24抗原の細胞外領域（配列番号7）を発現するプラスミド、psHM164を作製した。

#### 塩基配列決定

psHM及びpsHM164の塩基配列決定は自動DNAシーケンサー（Applied Biosystem Inc.社製）およびTaq Dye terminator Cycle Sequencing kit（Applied Biosystem Inc.社製）を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って行った。配列番号8及び9に示したプライマー（サワディーテクノロジー社製）を用いた。その結果、可溶性抗原にHAタグペプチドをつないだ融合タンパク（配列番号10及び11）が発現する構造になっていることを確認した。

#### 実施例2. 可溶性ヒトHM1.24抗原高発現細胞の樹立

##### （1）CHO細胞へのトランスフェクション

HAタグ付加可溶性HM1.24抗原安定産生系を樹立するために、PvuI（GIBCO-BRL社製）で消化して得た直鎖状にした前記発現ベクター（psHM及びpsHM164）をエレクトロポレーション法によりCHO細胞DX



B11 株 (Medical Research Council collaboration Center より供与) に遺伝子導入した。ベクター 1  $\mu$ g を PBS (-) 中  $1.1 \times 10^7$  細胞/mL の 0.8 mL アリコートに加え、Gene Pulser 装置 (Bio-Rad 社製) を用いて 1.5 kV、25  $\mu$ F の容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーションされた細胞を、100 mLの10% FCS (GIBCO-BRL社製)、1% ペニシリンーストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製) 含有  $\alpha$ -MEM (ヌクレオシド不含有) 選択培地 (GIBCO-BRL 社製) に懸濁し、100  $\mu$ L/ウェル ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) で平底96穴プレート (FALCON社製) に播種した。37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて一晚培養した後、選択培地を更に100  $\mu$ L/ウェル加え、セレクションを行った。14日目にサンドイッチELISA (細胞株の選択の項参照) によるアッセイを行い、HA-sHM又はHA-sHM164 を高発現する24クローンを選択し、24ウェルプレートにて拡大培養 (1 mL/ウェル) した。これら核酸不含培地で選択したクローンは安定増殖を確認した後、更にアッセイを行い、それぞれ10クローンずつに絞った。

## (2) 細胞株の選択

後記の可溶性ヒトHM1.24のELISA は次のようにして行った。高産生の株を選択するために可溶性抗原の産生量を抗HA抗体 (Boehringer Mannheim 社製) とヒト型化抗HM1.24抗体 (小野浩一郎ら 第20回日本分子生物学会年会 一般演題 3-501-P-478) によるサンドイッチELISA で比較し、細胞株の選択を行った。精製抗原を得ていないため抗原濃度は分からないので、濃度の比較はELISA を行った際の細胞数を考慮した。

尚、本実施例では、再構成ヒト抗HM1.24抗体 (ヒト型化抗HM1.24抗体) としてW098/14580に記載の軽鎖バージョンaと重鎖バージョンsを用いた。軽鎖バージョンaを含むプラスミドを有する大腸菌

は、Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gK) として、工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成8年(1997年)8月29日に、FERM BP-5645としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、ヒト型化抗HM1.24抗体の重鎖バージョンを含むプラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成9年(1997年)9月29日に、FERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

抗HA抗体(Boehringer Mannheim 社製)をCoating Buffer (C.B.: 0.1 mol/L 重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.6、0.02% ナトリウムアジド)にて1  $\mu$ g/mLに調製したものを、100  $\mu$ L/wellで平底96穴プレート(Nunc社製)に添加し、4℃で一晩コーティングした。

プレート洗浄器を用いて、300  $\mu$ L/ウェルの0.05% Tween 20を含むPBS (-)にて3回洗浄した抗HA抗体コーティングプレートに200  $\mu$ L/ウェルで希釈緩衝液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.1、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.15 mol/L NaCl、0.05% Tween 20、0.02% ナトリウムアジド、1% BSA)を加え、室温で2時間ブロッキングを行った。希釈緩衝液を捨てた後、CHO細胞による培養上清をそのまま又は適宜希釈緩衝液で希釈したものを100  $\mu$ L/ウェル加え、室温で2時間反応させた。

陽性対照としてCGM/sHM (尾寄恭子ら 60回日本血液学会 一般演題 690)を用いた。次に、同様に洗浄したプレートにヒト型化抗HM1.24抗体(小野浩一郎ら 第20回日本分子生物学会年会 一般演題 3-501-P-478)を1  $\mu$ g/mLに希釈緩衝液で調製したものを100  $\mu$ L/ウェル加えて室温で1時間反応させた。同様に洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ヒトIgG抗体(BIOSOURCE 社製)を希釈緩衝液で5000倍希釈したものを100  $\mu$ L/ウェルずつ加え、室温

で1時間反応させた。

最後に、5回洗浄し、SIGMA104 (p-ニトロフェニルホスフェート  
ニナトリウム塩六水和物：SIGMA 社製) を基質緩衝液 (S.B.：0.05  
mol/L重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.8、10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ) で1 mg  
/mL にしたものを100  $\mu\text{L}$ /ウェルずつ加えて発色させ、MICROPLATE  
READER (BIO-RAD社製) で405 nm-655 nm の吸光度を測定した。

#### A. 10nmol/L MTXによる遺伝子増幅

それぞれHAタグを付加した、HM1.24抗原の膜貫通領域を欠損した  
可溶性HM1.24抗原 (sHM)及びsHM のC末端を欠損したsHM164の発現  
ベクターを導入したDXB11 細胞で、各10株ずつ (sHM 産生株：1-1,  
8-2, 9-3, 11-4, 14-5, -16, -17, -22, -23, -24, sHM164産生株  
：164-1, -2, -3, -5, -6, -7, -8, -10, -13, -16) について、25  
 $\text{cm}^2$  フラスコにて10 nmol/L メトトレキサート (Methotrexate) (M  
TX) 含有培地 ( $\alpha$ -MEM (GIBCO-BRL 社製)、10% FCS (GIBCO-BRL社  
製、1% ペニシリンーストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製)、10  
0 nmol/L MTX (SIGMA 社製)) で培養した。

8日後、培養上清 (3日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定し  
た。発現量が高く、かつ細胞が十分に増えていたsHM 産生株である  
11-4並びにsHM164産生株である164-2 及び164-13について100 nmol  
/L MTXによる遺伝子増幅を行った (後基B. 項参照)。残りの株は  
十分に10 nmol/L MTX に適応していなかったため、さらに10 nmol/  
L MTX 培地で培養を続けた。

11日後、培養上清 (3日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定し  
、発現量の高かったsHM 産生株8-2, 9-3, 14-16 及び14-24 並びに  
sHM164産生株164-1, 164-5及び164-8 についても100 nmol/L MTXに  
よる遺伝子増幅を行った (後基B. 項参照)。この時点で最も産生  
量の高かった164-13はCGM/sHM (尾寄恭子ら 第60回日本血液学会

一般演題 690) の約10倍の抗原産生量を示した。

#### B. 100 nmol/L MTXによる遺伝子増幅

sHM 産生株及びsHM164産生株について、10 nmol/L MTX 培地で抗原産生量の高かった各5株ずつ (sHM 産生株8-2, 9-3, 11-4, 14-16 及び14-24 並びにsHM164産生株164-1, 164-2, 164-5, 164-8及び164-13) について、100 nmol/L MTXによる遺伝子増幅を行った。

10 nmol/L MTX 培地に適応したものから順に細胞数に応じて1/15, 1/10又は1/4量を25 cm<sup>2</sup>フラスコに継代した。10 nmol/L MTX 培地で1日培養後、100 nmol/L MTX培地 ( $\alpha$ -MEM (GIBCO-BRL 社製)、10% FCS (GIBCO-BRL社製)、1% ペニシリンーストレプトマイシン (GIBCO-BRL 社製)、100 nmol/L MTX (SIGMA 社製)) に交換し、以降100 nmol/L MTX培地で培養を行った。sHM 産生株11-4、並びにsHM164産生株164-2 及び164-13は19日後、sHM 産生株8-2, 9-3, 14-16 及び14-24 並びにsHM164産生株164-1, 164-5及び164-8 は8日後、培養上清 (2日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定した。

さらに産生量の高い、あるいは高くなる可能性のあるsHM 産生株8-2、並びにsHM164産生株164-2 及び164-13について100 nmol/L MTX培地で培養を続け、15日後、培養上清 (3日培養) 中の抗原産生量を再度ELISA で測定した。当初、最も産生量の高かった164-2 株はCGM/sHM (尾寄恭子ら 第60回日本血液学会 一般演題 690) の5倍以上の抗原産生量を示した。しかし、継代を重ねると最も産生量の高かった164-2 株はCGM/sHM より若干劣る抗原産生量を示し、産生量が下がる傾向が見られた。これより、限界希釈法によりシングルクローン化を行うこととした。

#### C. 限界希釈法によるシングルクローン化

sHM 産生株8-2 並びにsHM164産生株164-2 及び164-13について、限界希釈法によるシングルクローン化を行った。

8-2, 164-2及び164-13をそれぞれ100 nmol/L MTX培地で1.7 細胞/mL に調製し、96ウェルプレート各3枚に150  $\mu$ L/ウェル (0.25細胞/ウェル) 分注した。13日培養後、コロニーの形成が見られたウェル (8-2 : 13ウェル、164-2 : 36ウェル、164-13 : 23 ウェル) の培養上清 (4日培養) 中の抗原産生量をELISA で測定した。

産生量の高かったウェル (8-2 : 6ウェル、164-2 : 15ウェル、164-13 : 9 ウェル) から細胞を24ウェルプレートへ継代した。継代用と測定用の2枚のプレートを用意し、測定用のプレートはコンフルエントになった時点で培地交換し、3日培養し、培養上清中の抗原産生量をELISA で測定した。

96ウェル由来164-2 から、最終的にCGM/sHM (尾寄恭子ら 第60回日本血液学会 一般演題 690) で作製したものの約100 倍程度の産生量を示す4株 (164-2-1, 164-2-13, 164-2-17 及び164-2-31) が得られた (図. 2)。

#### D. ウェスタンブロット

164-2-1, 164-2-13, 164-2-17 及び164-2-31の細胞株を25 cm<sup>2</sup> フラスコ/ 5 mL培地で1日、3日、及び5日培養した培養上清についてウェスタンブロットを行った。

培養上清5  $\mu$ L をPBS (-) で総量 10  $\mu$ L に調製し、それぞれにSDS-サンプル緩衝液 (還元TEFCO 社製) を等量加えた。これらを100  $^{\circ}$ Cで5分加熱した後、SDS-PAGE (18 mA、1.5 時間) を行った。但し、ゲルは分離ゲル12.5% とスタックゲル4.5%のミニスラブをLaemi の方法 (Current Protocols in Molecular Biology 10.2.6-10.2.6) に従って作製した。泳動後、ゲルをPVDFメンブレン (ミリポア社製) にトランスブロット (10 V、30分) した。そのメンブレンを5% FBS を含むTris緩衝液 (TBS (宝酒造社製)) 中で25 $^{\circ}$ Cにて1時間振とうして、ブロッキングを行った。

0.05% Tween 20を含むTBS (TBS-T) でゆすいだ後、50  $\mu$ g/mLマウス抗HM1.24抗体 (Blood (1994) 84, 1922-1930) を加え、25°Cで振とうしながら1時間反応させた。TBS-T を加えて室温で振とうしながら10分間隔で6回緩衝液を交換して、メンブレンを洗浄した。続いて、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG 抗体 (Zymed 社製) ) をTBS-T にて2000倍希釈したものを二次抗体として同様に25°Cで振とうしながら30分間反応させた。

反応後、TBS-T を加えて25°Cで10分間の振とうを6回繰り返してメンブレンを洗浄した。このメンブレンをBCIP/NBT発色基質 (Promega 社製) ) を用いて 33  $\mu$ L のニトロブルーテトラゾリウム (NBT)と 16.5  $\mu$ L の5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート (BCIP) を含むウエスタン検出緩衝液 (0.1 mol/L NaCl、5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>を含む0.1 mol/L Tris-HCl緩衝液、pH 9.5) に膜を浸して発色させた。

バックグラウンドが上がらない程度にdevelop させた後、蒸留水で洗浄しHM1.24抗原を検出した。図3に示したように得られた4クローン (164-2-1, 164-2-13, 164-2-17 及び164-2-31) とも還元状態で、糖鎖修飾によるヘテロジェネティーと考えられる23-28 kDaのブロードなバンドとして可溶性抗原が検出された。但し、18 kDa、14 kDa付近にHM抗原タンパク質由来のヘテロバンドを認めたため、クロマトを行って、これを除いたものを可溶性抗原とすることとした。

### 実施例 3. 可溶性ヒトHM1.24抗原の精製

可溶性ヒトHM1.24抗原発現CHO 細胞培養上清より、可溶性ヒトHM1.24抗原を精製した。可溶性ヒトHM1.24抗原発現CHO 細胞を培養液 [10% FBS (MOREGATE 社製)、1% ペニシリナーstreptomycin (GIBCO-BRL 社製)、500 nmol/L MTX (Sigma 社製) を含む $\alpha$ ME

M 培地 (GIBCO-BRL 社製) ] 中で、37℃、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。培養上清約 2 Lを遠心により、回収した。

AHM コンジュゲートアフィニティーカラム (約300 mgのAHM をコンジュゲートしたCNBr- 活性化セファロース 4FF) に、培養上清をアプライし、PBS (10XPBS)を10倍希釈したもの：ナカライ) で洗った後、0.2 mol/L Glycine バッファー (pH 2.48)で溶出した。この画分を、VyDAC C4カラムを用いた逆相クロマトグラフィーにて、アセトニトリルの濃度勾配で溶出し、粗精製品を得た。

さらに、粗精製品を、同様の逆相クロマトグラフィーで、2回のリクロマトグラフィーを行うことによって精製した。この精製品を、PBS で5倍希釈し、Fast Desalting HR10/10カラムを用いて、PBS にバッファー置換を行った。280 nmの吸収から、得られた可溶性ヒトHM1.24抗原の濃度は約0.382 mg/mL と試算され、合計42 mL の精製品が得られた。精製度は、逆相クロマトグラフィーのピーク面積比から、95% 以上の純度であった。

#### 実施例 4. 精製可溶性ヒトHM1.24抗原を用いたELISA 系の構築

抗HA抗体 (Boehringer Mannheim 社製) をコート緩衝液 (C.B.: 0.1 mol/L 重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.6、0.02% ナトリウムアジド) にて 1 µg/mLに調製したものを、100 µL/ウェルで平底96穴プレート (Nunc社製) に添加し、4℃で一晩コーティングした。0.05% Tween 20を含むPBS (-) にて洗浄した抗HA抗体コーティングプレートに200 µL/ウェルで希釈緩衝液 (50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.1、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.15 mol/L NaCl、0.05% Tween 20、0.02% ナトリウムアジド、1% BSA)を加え、室温で2時間ブロッキングを行った。

希釈緩衝液を捨てた後、精製HM1.24抗原を希釈緩衝液で750倍、2250倍、6750倍、20250倍、又は60750倍希釈したものを100 µL/

ウェル加え、室温で1時間反応させた。次に、同様に洗浄したプレートにヒト型化抗HM1.24抗体（小野浩一郎ら 第20回日本分子生物学会年会 一般演題 3-501-P-478）を1  $\mu\text{g/mL}$ に希釈緩衝液で調製したものを100  $\mu\text{L}$ /ウェル加えて室温で1時間反応させた。同様に洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE 社製）を希釈緩衝液で5000倍希釈したものを100  $\mu\text{L}$ /ウェルずつ加え、室温で1時間反応させた。

最後に、5回洗浄し、SIGMA104（SIGMA 社製）を基質として基質緩衝液（S.B.: 0.05 mol/L重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.8、10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ）で1 mg/mLにしたものを100  $\mu\text{L}$ /ウェルずつ加えて発色させ、マイクロプレートリーダー（BIO-RAD 社製）で405 nm-655 nmの吸光度を測定した、図4に示したとおりのヒト型化抗HM1.24抗体の標準曲線が得られ、これより5000倍希釈での使用が妥当であると判断した。また、図5に5000倍希釈で精製抗原を使用した際のELISA系におけるヒト型化抗HM1.24抗体の標準曲線を示したが、測定限界は約500 pg/mLであった。

#### 参考例 1. マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

Goto, T. et al., Blood (1994) 84, 1992-1930 に記載の方法にて、マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製した。

ヒト多発性骨髄腫患者骨髄由来の形質細胞株KPC-32 ( $1 \times 10^7$  個) (Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400) をBALB/Cマウス（チャールスリバー製）の腹腔内に6週間おきに2回注射した。

このマウスを屠殺する3日前にマウスの抗体産生価をさらに上昇させるために、 $1.5 \times 10^6$  個のKPC-32をマウスの脾臓内に注射した（



Goto, T. et al., Tokushima J. Exp. Med. (1990) 37, 89 )。マウスを屠殺した後に脾臓を摘出し、Groth, de St. & Schreideggerの方法 (Cancer Research (1981) 41, 3465 ) に従い摘出した脾臓細胞とミエローマ細胞SP2/0 を細胞融合に付した。

KPC-32を用いたCell ELISA (Posner, M. R. et al., J. Immunol. Methods (1982) 48, 23 ) によりハイブリドーマ培養上清中の抗体のスクリーニングを行った。5x10<sup>4</sup> 個のKPC-32を50 ml のPBS に懸濁し、96穴プレート (U 底型、Corning, Iwaki製) に分注し37℃で一晩風乾した。1%ウシ血清アルブミン (BSA ) を含むPBS でブロックした後、ハイブリドーマ培養上清を加え4℃にて2 時間インキュベートした。次いで、4℃にて1 時間ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG ヤギ抗体 (Zymed 製) を反応させ、洗浄後室温にて30分間o-フェニレンジアミン基質溶液 (Sumitomo Bakelite 製) を反応させた。

1 mol/L 硫酸で反応を停止させ、ELISA reader (Bio-Rad 製) で492nm における吸光度を測定した。ヒト免疫グロブリンに対する抗体を産生するハイブリドーマを除去するために、陽性ハイブリドーマ培養上清をヒト血清にあらかじめ吸着させ、他の細胞株に対する反応性をELISA にてスクリーニングした。陽性のハイブリドーマを選択し、種々の細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで調べた。最後に選択されたハイブリドーマクローンを二度クローン化し、これをプリスタン処理したBALB/Cマウスの腹腔に注射して、腹水を取得した。

モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウムによる沈澱とプロテインA アフィニティークロマトグラフィーキット (Ampure PA、Amersham製) によりマウス腹水より精製した。精製抗体は、Quick Tag FITC結合キット (ベーリンガーマンハイム製) を使用することにより

FITC標識した。

その結果、30のハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体がKPC-32およびRPMI 8226 と反応した。クローニングの後、これらのハイブリドーマの培養上清と他の細胞株あるいは末梢血単核球との反応性を調べた。

このうち、3つのクローンが形質細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であった。これらの3つのクローンのうち、最もフローサイトメトリー分析に有用であり、かつRPMI 8226 に対するCDC活性を有するハイブリドーマクローンを選択し、HM1.24と名付けた。このハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のサブクラスを、サブクラス特異的抗マウスウサギ抗体（Zymed 製）を用いたELISAにて決定した。抗HM1.24抗体は、IgG2a  $\kappa$  のサブクラスを有していた。抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマHM1.24は、工業技術院生命工学工業研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成7年9月14日にFERM BP-5233としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 参考例 2. ヒト型化抗HM1.24抗体の作製

ヒト型化抗HM1.24抗体を下記の方法により得た。

参考例1で作製されたハイブリドーマHM1.24から、常法により全RNAを調製した。これよりマウス抗体V領域をコードするcDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法および5'-RACE法により、合成、増幅した。マウスV領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を得、これらのDNA断片を各々プラスミドpUC系クローニングベクターに連結し、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。この形質転換体から上記プラスミドを得、プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を常法に従い決定し、さらに各々のV領域の相補性決定領域（CDR）を決定した。

キメラ抗HM1.24抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウス抗HM1.24抗体L鎖およびH鎖のV領域をコードするcDNAをHEFベクターに挿入した。また、ヒト型化抗HM1.24抗体を作製するために、CDR移植法によりマウス抗HM1.24抗体のV領域CDRをヒト抗体へ移植した。ヒト抗体のL鎖としてヒト抗体REIのL鎖を用い、ヒト抗体H鎖としてフレームワーク領域（FR）1-3についてはヒト抗体HG3のFR1-3を用いFR4についてはヒト抗体JH6のFR4を用いた。CDRを移植した抗体が適切な抗原結合部位を形成するようにH鎖V領域のFRのアミノ酸を置換した。

このようにして作製したヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖の遺伝子を哺乳類細胞で発現させるために、HEFベクターに、各々の遺伝子を別々に導入し、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖またはH鎖を発現するベクターを作製した。

これら二つの発現ベクターをCHO細胞に同時に導入することにより、ヒト型化抗HM1.24抗体を産生する細胞株を樹立した。この細胞株を培養して得られたヒト型化抗HM1.24抗体のヒト羊膜由来細胞株WISHへの抗原結合活性および結合阻害活性を、Cell ELISAにて調べた。その結果、ヒト型化抗HM1.24抗体は、キメラ抗体と同等の抗原結合活性を有し、さらにビオチン化マウス抗HM1.24抗体を用いた結合阻害活性についても、キメラ抗体あるいはマウス抗体と同等の活性を有した。

なお、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖V領域およびH鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-1.24L-g $\kappa$ ）および*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1）として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき

国際寄託された。

また、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖V領域aバージョン（配列番号：12）およびH鎖V領域rバージョン（配列番号：13）をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-RVLa-AHM-gk）および*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1）として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

また、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖V領域sバージョン（配列番号：14）をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1）として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成9年（1997年）9月29日にFERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

### 参考例 3. HM1.24抗原をコードするcDNAのクローニング

#### 1) 細胞株

ヒト骨髓腫細胞株RPMI8226, U266は10% ウシ胎児血清（FBS）を添加したRPMI1640培地（GIBCO-BRL）にて培養を行い、ヒト骨髓腫細胞株KPM2（特開平7-236475）は20% ウシ胎児血清を添加したRPMI1640培地にて培養を行った。

#### 2) cDNAライブラリーの構築

$1 \times 10^8$  個のKPM2細胞よりチオシアン酸グアニン／塩化セシウム法により全RNAを単離し、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いてmRNAの精製を行った。10  $\mu$ g のmRNAよりNot I /oligo-dT<sub>18</sub> (Time Saver cDNA Synthesis Kit ; Pharmacia Biotech) を用いてcDNAを合成した後、EcoRI adapterを連結した。

0.7kbp以上のcDNAを1.0%低融点アガロースゲル (Sigma) を用いて分画し、NotIにて消化しpCOS1 発現ベクター又は $\lambda$  ExCellベクター (Pharmacia Biotech) のEcoRI / Not I site に挿入し、直接発現クローニング (panning によるスクリーニング) に用いるライブラリー (ライブラリーA) 及び免疫スクリーニング用のライブラリー (ライブラリーB) をそれぞれ構築した。

なお、pCOS1 発現ベクターは、HEF-PMh- $\gamma$ 1 (W092-19759参照) から、EcoRI およびSmaI消化により含有される遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

### 3) Panning

ライブラリーAをエレクトロポレーション法によりCOS-7 細胞に導入した。すなわち、20  $\mu$ g のプラスミドDNA ( $5 \times 10^5$  個の独立クローンを含む) を0.8 mlの細胞 ( $1 \times 10^7$  細胞/ml in PBS) と混合し、Gene Pulser (Bio-Rad) を用いて1.5 kV、25  $\mu$ F の条件にてエレクトロポレーションを行った。室温にて10分間清置した後、細胞を10% FBS 添加DMEM (GIBCO-BRL)に懸濁し4枚の100 mm培養ディッシュに分け37℃にて72時間培養した。

培養後細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、5 mM EDTA を含むPBS を加え細胞を剥がし、5% FBS、0.02%  $\text{NaN}_3$  添加PBS にて $1-2 \times 10^6$  cells/ml の細胞懸濁液を調整した。続いて細胞は抗HM1.24抗体をコーティングしたpanning プレート (後述) 上で2時間清置し、プレートを5% FBS、0.02%  $\text{NaN}_3$ を含む3 mlのPBS で穏やかに3回洗浄した。洗浄後、プレート上に結合した細胞から、Hirtの溶液 (Hitt J., Mol.Biol. 26 : 365-369, 1983) (0.6% SDS、10mM EDTA) を用いてプラスミドDNA を回収した。回収したプラスミドDNAは大腸菌内で増幅し、次のpanning に使用した。

Panning プレーットの調製は次のようにして行った。3 mlの抗HM1.24抗体溶液 ( $10 \mu\text{g/ml}$  in 50mM Tris-HCl、pH 9.5) を60 mmディッシュ (Falcon) に加え、室温にて2時間清置し、0.15M NaClにて3回洗浄した後、3 mlの5% FBS、1 mM EDTA、0.02%  $\text{NaN}_3$  添加PBSを加え、室温にて2時間清置しブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去した後panning プレーットは使用するまで $-20^\circ\text{C}$ で保存した。

$5 \times 10^5$  個のクローンを含むプラスミドライブラリー (ライブラリーA) を出発材料としてpanning を3回繰り返すことにより、約0.9kbpのcDNAをインサートとして持つプラスミドDNAが濃縮された。Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて373Aもしくは377DNA Sequencer (Applied Biosystems) により塩基配列の決定を行った結果、クローンP3.19は1,012bpのcDNAから成り、180アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (23-549) を持つことが明らかとなった (図6及び図7) (配列番号: 15)。このcDNAより予想されるアミノ酸配列はタイプIIの膜タンパクに特徴的な構造を示し、2箇所のN型糖鎖結合部位を有していた。

#### 4) 免疫スクリーニング

ライブラリーBは抗HM1.24抗体を用いた免疫スクリーニングに供した。すなわち、 $1.5 \times 10^5$  個の独立クローンを含むファージライブラリーを大腸菌NM522 (Pharmacia Biotech) と共に寒天上に重層し、 $42^\circ\text{C}$ にて3.5時間培養した。培養後、プレート上に10mM IPTGで前処置したニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell) を重ね、さらに $37^\circ\text{C}$ にて3時間培養した。Filterは0.05% (v/v) Tween-20添加TBS (20mM Tris-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl) で洗浄した後、1% (w/v) BSA 添加TBSを加え、室温にて1時間インキ

ュベートしてブロッキングを行った。

ブロッキング後、抗HM1.24抗体溶液（10  $\mu$ g/mlブロッキング緩衝液）を加え、室温にて1時間インキュベートし、洗浄後5,000倍希釈したアルカリホスファターゼ結合抗マウスIg抗血清（picoBlue Immunoscreening kit; Stratagene）を加え、さらに室温にて1時間インキュベートした。抗体と反応したスポットは0.3mg/mlニトロブルーテトラゾリウム、0.15mg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェートを含む発色溶液（100mM Tris-HCl、pH 9.5、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>）にて発色させた。

免疫スクリーニングにより5個の陽性クローンが単離され、それら全てがP3.19の部分配列と一致した（図8）。ホモロジー検索の結果、P3.19は骨髄または滑膜ストローマ細胞に発現するBST-2（Ishikawa J. ら、Genomics, 26; 527-534, 1995）の塩基配列と同一のものであることが明らかとなった。二通りのスクリーニング法により同一の分子が得られ、P3.19がコードする膜タンパクはHM1.24抗原分子であることを強く示唆している。

なお、前記ヒトHM1.24抗原タンパク質と同一の配列を有するヒトタンパク質をコードするDNAをpUCベクターのXbaI切断部位間に挿入したプラスミドpRS38-pUC19を含有する大腸菌はEscherichia coli DH5  $\alpha$ （pRS38-pUC19）と命名され、平成5（1993）年10月5日に工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託番号FERM BP-4434として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### 5) FACS解析

さらに、P3.19によってコードされるタンパクが確かに抗HM1.24抗体と結合するのかを確認するために、P3.19を導入したCHO形質転換細胞株を樹立した。すなわち、P3.19クローンをエレクトロポ

レーション法によりCHO 細胞に導入した後、500  $\mu\text{g/ml}$ のG418 (GIBCO-BRL)の存在下で培養し、HM1.24抗原発現CHO 細胞株を得た。

$1 \times 10^6$  個の培養細胞をFACS緩衝液 (PBS (-)/2% FCS/0.1%  $\text{NaN}_3$ ) に懸濁し、HM1.24抗体を添加し、氷中で30分間反応した。FACS緩衝液で洗浄後、GAM-FITC溶液 (25  $\mu\text{g/ml}$  in FACS緩衝液; Becton Dickinson) で再懸濁し、さらに氷中で30分間反応した。FACS緩衝液で2回洗浄した後、600  $\mu\text{l}$  のFACS緩衝液に再懸濁しFACScan (Becton Dickinson) にて測定した。

なお、陰性対照抗体としてUPC10 を用いた。

FACS解析の結果、P3.19 を導入したCHO 細胞は抗HM1.24抗体と強く反応したのに対し、コントロールの発現ベクターのみを導入したCHO 細胞 (CHO/NEO) では有意な結合は認められなかった (図9)。したがって、P3.19 によってコードされるタンパク質は抗HM1.24抗体と結合することが確認された。

#### 6) 免疫沈降

細胞はPBS (-) で2回洗浄した後、細胞溶解緩衝液 (50mM 萌酸ナトリウム、150mM NaCl、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、1% Nonidet P-40、0.1mg/mlフェニルメチルスルホニルフルオリド、プロテアーゼ阻害剤カクテニル [Boehringer Mannheim]) 内で超音波破碎を行い、可溶化画分を得た。可溶化画分は抗HM1.24抗体をコンジュゲートしたSepharose 4Bビーズに加えた。遠心後、沈殿物はSDS-PAGE (12% gel)により分離し、PVDF膜に転写した。PVDF膜は抗HM1.24抗体、続いてPOD-anti-mouse IgGと反応させた後、ECL キット (Amersham) を用いて検出を行った。

KPMM2, RPMI8226 及びU266の各種ミエローマ細胞株はHM1.24抗原を強く発現し、これらの細胞溶解物を抗HM1.24抗体で免疫沈降を行うと、分子量が約29~33kDa のタンパクが特異的に検出された (図



10)。P3.19を導入したCHO細胞株(CHO/HM)においても同様の実験を行った結果、CHO/HM細胞においてもミエローマ細胞株と同様に免疫沈降物が確認され(図10、レーン4)、発現ベクターpCOS1のみを導入したコントロール細胞(CHO/NEO)ではそのような免疫沈降物は確認されなかった(図10、レーン5)。

P3.19は180アミノ酸からなる推定分子量19.8kDaのタンパクをコードしており、2カ所のN型糖鎖結合モチーフが存在している(図6)。従って、免疫沈降により認められた分子量の異なったものの存在は、N型糖鎖の修飾の違いによることが考えられた。事実、免疫沈降物が数種のレクチンと結合することが確認されている。

#### 産業上の利用可能性

HM1.24抗原高産生株を樹立し得たため、2Lという培養上清から16mgの精製抗原を得ることが出来た。精製抗原を用いたELISA系を確立したため、培養上清を用いたELISA系と比較して4℃で一晩インキュベートする必要はなくなり、室温で1時間反応させればよく、反応時間の短縮が行えた。また、培養上清に含まれる成分によるELISA系への関与もなくなり、血清中の投与した抗HM1.24抗体の濃度測定系としても安定して利用できる。

PCT規則第13規則の2に規定する寄託された微生物への言及及び国際寄託当局

#### 国際寄託当局

名 称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6

(1) 名 称 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pRS38-pUC19)

寄託番号 FERM BP-4434

寄託日 1993年10月5日

- (2) 名 称 Mouse-mouse hybridoma HM1.24  
寄託番号 FERM BP-5233  
寄託日 1995年 9 月14日
- (3) 名 称 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1)  
寄託番号 FERM BP-5643  
寄託日 1996年 8 月29日
- (4) 名 称 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pU19-1.24H-g $\gamma$ 1)  
寄託番号 FERM BP-5644  
寄託日 1996年 8 月29日
- (5) 名 称 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gk)  
寄託番号 FERM BP-5645  
寄託日 1996年 8 月29日
- (6) 名 称 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-gk)  
寄託番号 FERM BP-5646  
寄託日 1996年 8 月29日
- (7) 名 称 Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1)  
寄託番号 FERM BP-6127  
寄託日 1997年 9 月29日

## 請 求 の 範 囲

1. EF1  $\alpha$  プロモーターと、その下流に連結された、細胞内ドメインを欠く可溶性HM1.24抗原をコードする遺伝子とを含んで成る発現ベクターにより形質転換された動物細胞を培養し、そして培養物から可溶性HM1.24抗原単離・精製することを特徴とする可溶性HM1.24抗原細胞外ドメインの製造方法。

2. 前記可溶性HM1.24抗原が配列番号：5又は16に示すアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の方法。

3. 前記可溶性HM1.24抗原が配列番号：7又は17に示すアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の方法。

4. 前記可溶性HM1.24抗原がインフルエンザ凝集素（HA）との融合蛋白質の形である請求項1に記載の方法。

5. 前記融合蛋白質が配列番号：10又は18に記載のアミノ酸配列を有する、請求項4に記載の方法。

6. 前記融合蛋白質が配列番号：11又は19に記載のアミノ酸配列を有する、請求項4に記載の方法。

7. 前記動物細胞がCHO細胞である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

8. 形質転換された動物細胞が100 nmol/Lの濃度のメトトレキサート（MTX）の存在下に遺伝子増幅を行ったものである、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

9. 請求項1～8のいずれか1項に記載の方法により製造された可溶性HM1.24抗原タンパク質と被験試料中に含まれる抗HM1.24抗体とを反応させて、可溶性HM1.24抗原タンパク質に結合した抗HM1.24抗体を検出又は測定する工程を含む、抗HM1.24抗体の免疫化学的測定方法。

10. 前記可溶性HM1.24抗原タンパク質が、支持体と結合していることを特徴とする、請求項1に記載の免疫化学的測定方法。

11. 前記可溶性HM1.24抗原タンパク質が、他のペプチド又はポリペプチドと融合していることを特徴とする、請求項9又は10に記載の免疫化学的測定方法。

12. 支持体がビーズ又はプレートであることを特徴とする、請求項10に記載の免疫化学的測定方法。

13. 可溶性HM1.24抗原タンパク質に結合した抗HM1.24抗体又は抗HM1.24抗体に結合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を、抗HM1.24抗体に対する一次抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質に対する一次抗体により検出又は測定することを特徴とする請求項9～12のいずれか1項に記載の免疫化学的測定方法。

14. 可溶性HM1.24抗原タンパク質に結合した抗HM1.24抗体又は抗HM1.24抗体に結合した可溶性HM1.24抗原タンパク質を、抗HM1.24抗体に対する一次抗体又は可溶性HM1.24抗原タンパク質に対する一次抗体及び該一次抗体に対する二次抗体により検出又は測定することを特徴とする請求項9～12のいずれか1項に記載の免疫化学的測定方法。

15. 一次抗体又は二次抗体が放射性同位元素、酵素、ビオチン／アビジン又は蛍光物質により標識されていることを特徴とする請求項9～14のいずれか1項に記載の免疫化学的測定方法。

16. 請求項9～15に記載の方法を用いる品質管理方法。

17. 請求項16に記載の品質管理方法によって品質を管理された抗HM1.24抗体。

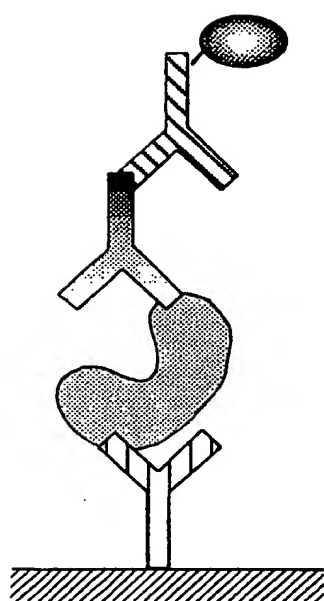
18. 請求項17に記載の抗HM1.24抗体を有効成分として含有する医薬組成物。

19. 請求項16に記載の品質管理方法を含む、抗HM1.24抗体の製造

方法。

20. 請求項16に記載の品質管理方法を含む、抗HM1.24抗体を有効成分として含有する医薬組成物の製造方法。

Fig.1



アルカリフォスファターゼ標識抗 I g G

抗 H M1.24抗体

H A タグ付加可溶型 H M1.24抗原

抗 H A 抗体

Fig. 2

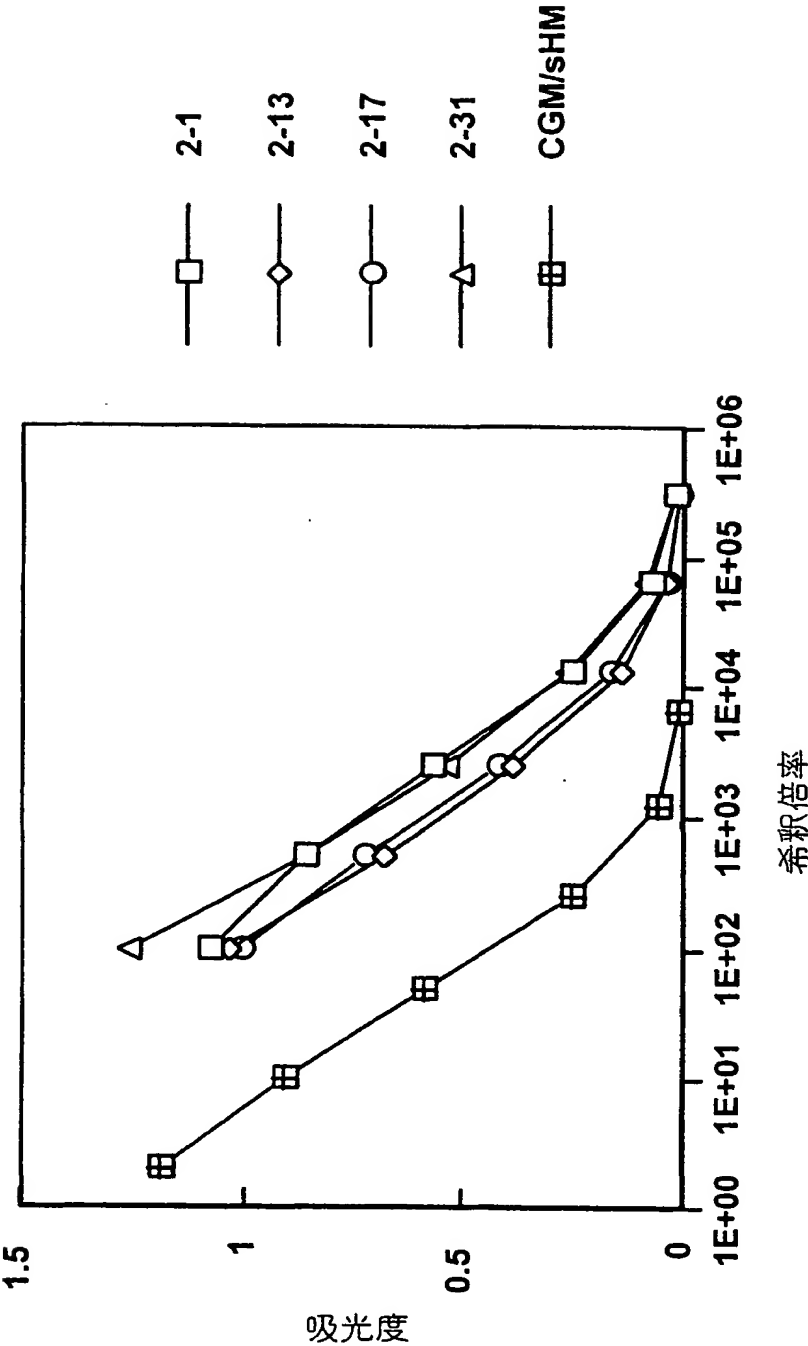
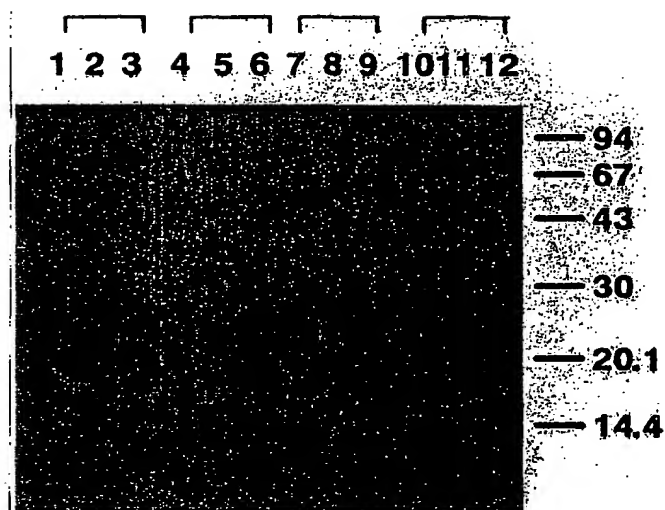


Fig.3



レーン1 : 164-2-1、1日培養上清  
 レーン2 : 164-2-1、3日培養上清  
 レーン3 : 164-2-1、5日培養上清  
 レーン4 : 164-2-13、1日培養上清  
 レーン5 : 164-2-13、3日培養上清  
 レーン6 : 164-2-13、5日培養上清  
 レーン7 : 164-2-17、1日培養上清  
 レーン8 : 164-2-17、3日培養上清  
 レーン9 : 164-2-17、5日培養上清  
 レーン10 : 164-2-31、1日培養上清  
 レーン11 : 164-2-31、3日培養上清  
 レーン12 : 164-2-31、5日培養上清



Fig. 4

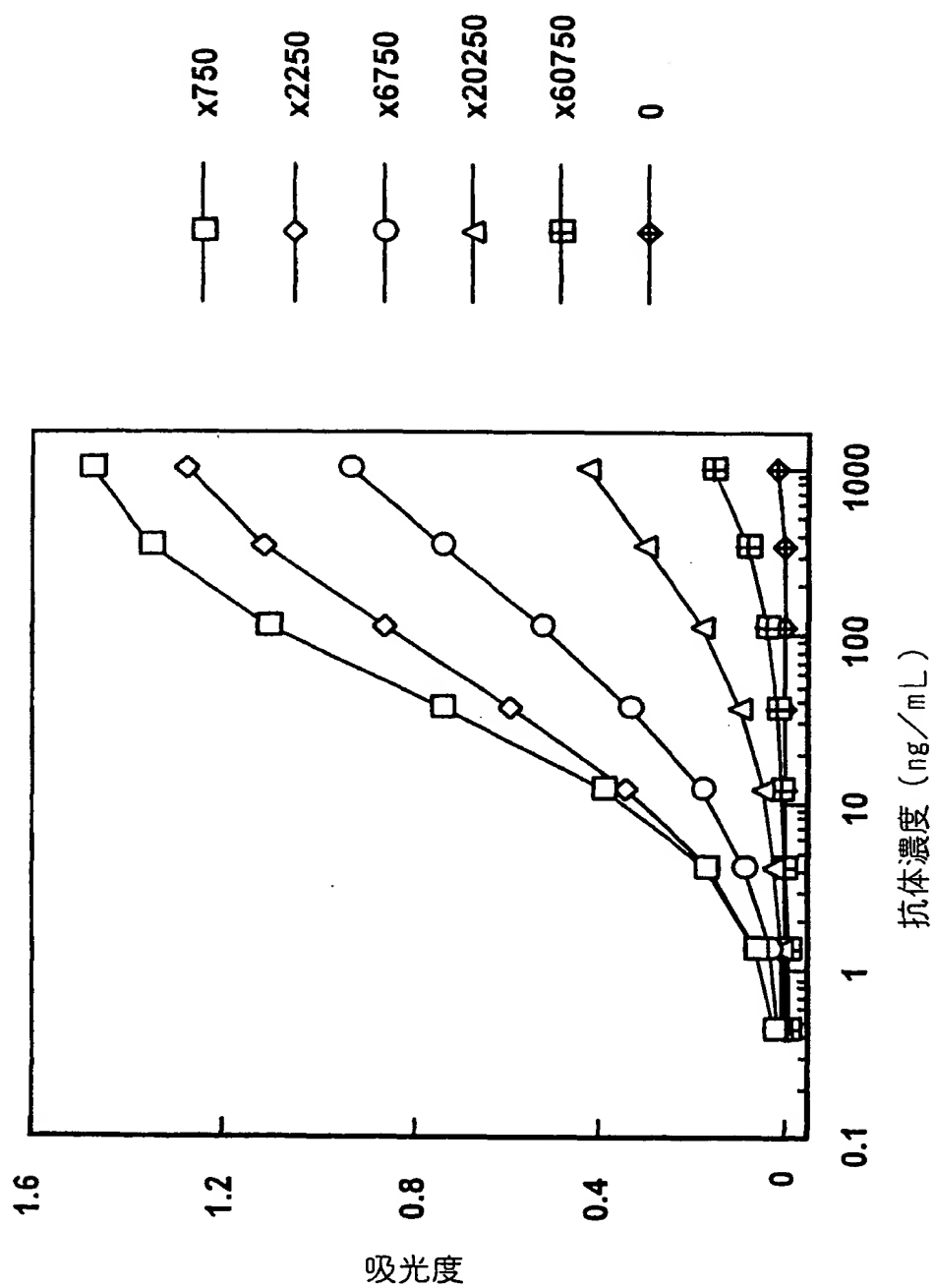


Fig. 5

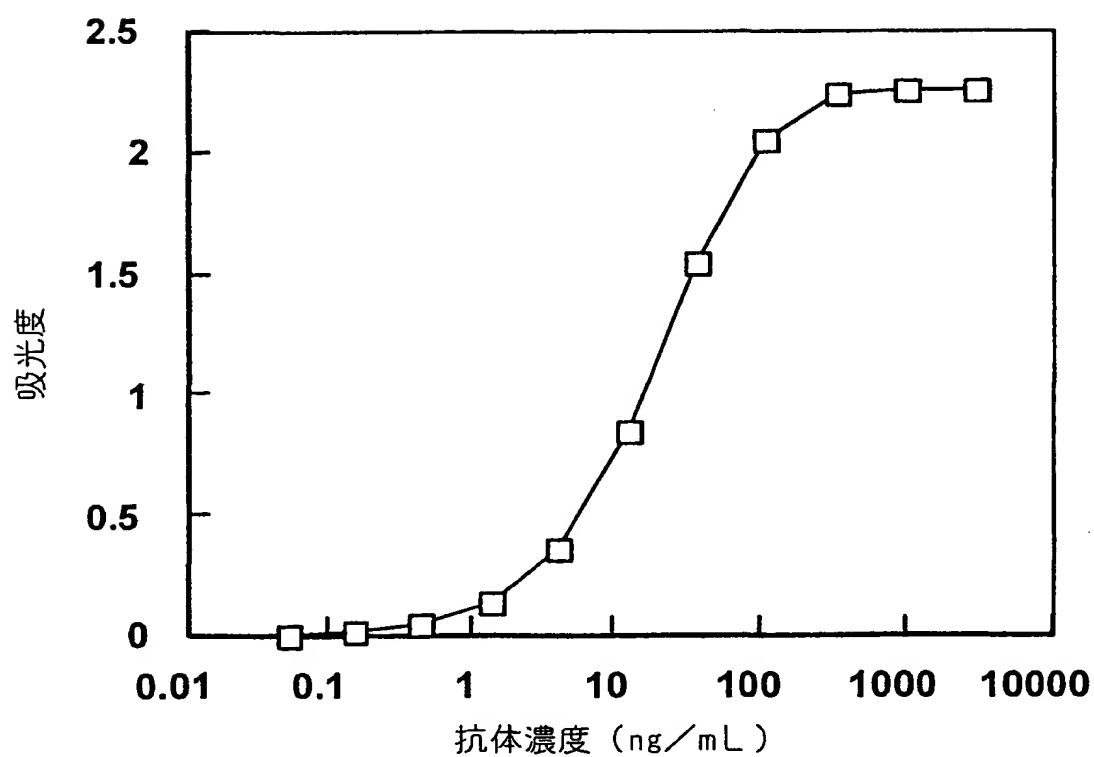


Fig.6

GAATTCGGCAGGAGATCTGGATGGCATCTACTTCGTATGACTATTGCAGAGTGCCCAT 60  
                   M A S T S Y D Y C R V P M 13  
 GGAAGACGGGGATAAGCGCTGTAAGCTTCTGCTGGGGATAGGAATTCTGGTGCTCCTGAT 120  
 E D G D K R C K L L L G I G I L V L L I 33  
 CATCGTGAATTCGGGGTGCCCTTGATTATCTTCACCATCAAGGCCAACAGCGAGGCCCTG 180  
 I V I L G V P L I I F T I K A N S E A C 53  
 CCGGACGGCCTTCGGGCAGTGATGGAGTGTGCGCAATGTCAACCATCTCCTGCAACAAGA 240  
 R D G L R A V M E C R N V T H L L Q Q E 73  
 GCTGACCGAGGCCCAGAGGGCTTTCAGGATGTGGAGGCCCGCCAGCCCGCCGCAACCA 300  
 L T E A Q K G F Q D V E A Q A A T C N H 93  
 CACTGTGATGGCCCTAATGGCTTCCCTGGATGCAGAGAGGCCCAAGGACAAAGAAAGT 360  
T V M A L M A S L D A E K A Q G Q K K V 113  
 GGAGGAGCTTGAGGAGAGATCACTACATTAAACCATTAAGCTTCAGGACGCGTCTGCAGA 420  
 E E L E G E I T T L N H K L Q D A S A E 133  
 GGTGGAGCGACTGAGAAGAGAAAACCAAGGTCTTAAGCGTGAGAAATCCGGGACAAGAATA 480  
 V E R L R R E N Q V L S V R I A D K K Y 153  
 CTACCCAGCTCCCAGGACTCCAGCTCCGCTGGGGCGCCCGCCAGCTGTGATTGTGCTGCT 540  
 Y P S S Q D S S S A A A P Q L L I V L L 173

(配列番号: 15)

Fig.7

GGGCCTCAGCGCTCTGCTGCAGTGAGATCCAGGAAGCTGGCACATCTTGGAAGTCCGT 600  
 G L S A L L Q \* 180  
 CCTGCTCGGCTTTTCGCTTGAACATTCCTCTGATCTCATCAGTTCTGAGCGGGTCATGGG 660  
 GCAACACGGTTAGCGGGAGAGCACGGGTAGCCGGAGAGAGGCCCTCTGGAGCAGGTCTG 720  
 GAGGGCCATGGGGCAGTCCTGGGTGTGGGGACACAGTCGGGTGACCCAGGCTGTCTC 780  
 CCTCCAGAGCCTCCCTCCGGACAATGAGTCCCCCTCTTGTCTCCCACCTGAGATTGGG 840  
 CATGGGGTGGGTGTGGGGGCGCATGTGCTGCCCTGTGTTATGGGTTTTTTTCCGGGGG 900  
 GGTGCTTTTTTCTGGGGTCTTTGAGCTCCAAAAAATAAACACTTCCCTTTGAGGGGAGAG 960  
 CACACCTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAATTCGGGGCGGCCCA 1014

(配列番号 : 15)

Fig. 8

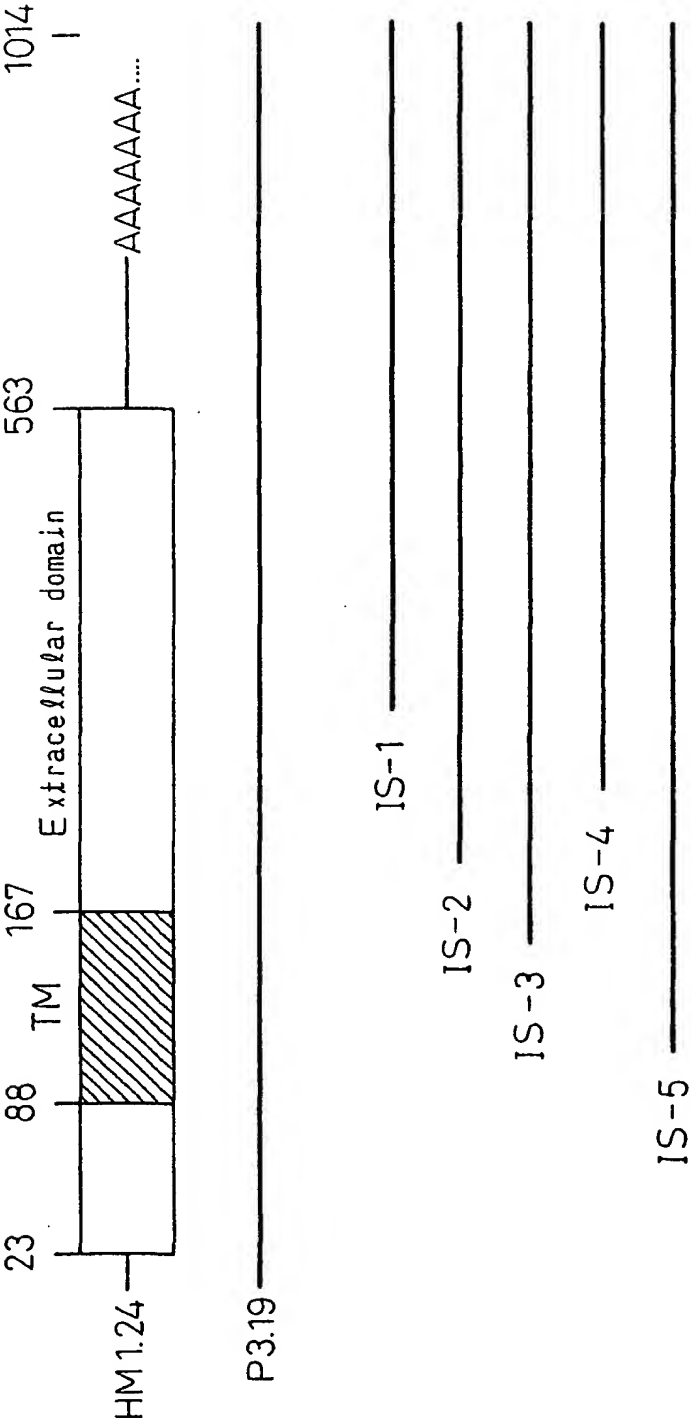


Fig. 9

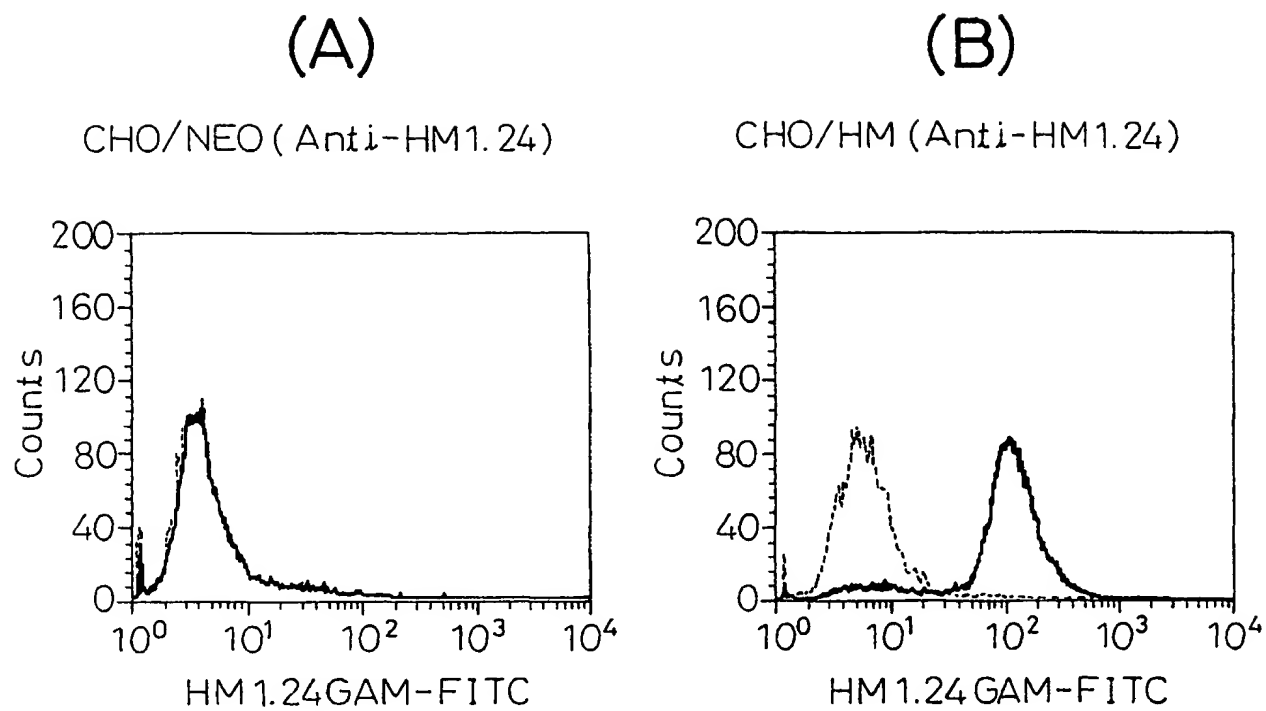
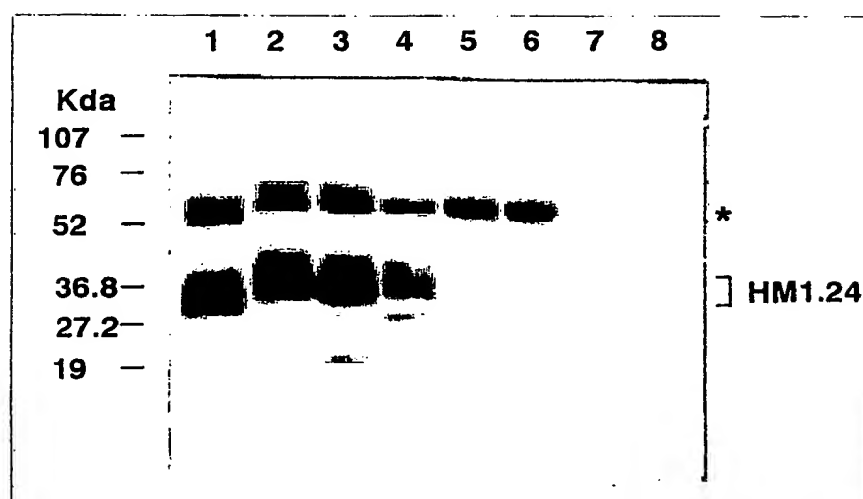


Fig.10



レーン1 : K P M M 2 (  $5 \times 10^5$  細胞相当 )  
 レーン2 : R P M I 8226 (  $25 \times 10^5$  細胞 )  
 レーン3 : U266 (  $25 \times 10^5$  細胞 )  
 レーン4 : C H O / H M (  $5 \times 10^5$  細胞 )  
 レーン5 : C H O / N E O (  $5 \times 10^5$  細胞 )  
 レーン6 : なし  
 レーン7 : K P M M 2 (  $5 \times 10^5$  細胞 )  
 レーン8 : C H O / H M (  $5 \times 10^5$  細胞 )

## SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120> Immunochemical Assay Method for Anti-HM 24 Antibody

<130> 1003378

<160>

<210> 1

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA comprising leader sequence and HA coding sequence

<400> 1

aattcccacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt 60

ccactcatac ccatacgacg tcccagacta cgctggtacc gcggccgcg 109

<210> 2

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA comprising leader sequence and HA coding sequence

<400> 2

gatccgcggc cgcggtacca gcgtagtctg ggacgtcgta tgggtatgag tggacacctg 60

tagctgttgc taccaagaag aggatgatac agctccatcc catggtggg 109

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Primer

<400> 3

taaaggtacc aacagcgagg cctgccg

27

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

ctgctgcagt gagatcccag gatccata

28

<210> 5

<211> 396

<212> DNA

<213> Homosapiens

<223> Nucleotide sequence of extracellular domain of soluble HM 1.24  
antigenic protein

<400> 1

aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc 48

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

1 5 10 15

aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag ggc 96

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

20 25 30

ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg atg 144

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

35 40 45

gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag aaa 192

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys  
 50 55 60  
 gtg gag gag ctt gag gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt cag 240  
 Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln  
 65 70 75 80  
 gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc tta 288  
 Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu  
 85 90 95  
 agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac tcc 336  
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
 100 105 110  
 agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg att gtg ctg ctg ggc ctc agc 384  
 Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser  
 115 120 125  
 gct ctg ctg cag 396  
 Ala Leu Leu Gln

130

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 6

ataggatcct caagcggagc tggagtcctg 30

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homosapiens

&lt;223&gt; Nucleotide sequence of extracellular domain of C-terminal-lacking soluble HM 1.24 antigenic protein

&lt;400&gt; 1

```

aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc      48
Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
  1             5             10            15
aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag ggc      96
Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
          20             25            30
ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg atg    144
Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met
          35             40            45
gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag aaa    192
Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
          50             55            60
gtg gag gag ctt gag gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt cag    240
Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln
          65             70            75            80
gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc tta    288
Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu
          85             90            95
agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac tcc    336
Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser
          100            105            110
agc tcc gct      345
Ser Ser Ala
          115

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 8

ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca gt

32

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

cctcagactc ggccctgaccc gtggaaagaa

30

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 429

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence coding for a fusion protein comprising HA peptide and soluble HM 1.24 antigenic protein

&lt;400&gt; 10

tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt acc aac agc gag gcc tgc 48

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys

1

5

10

15

cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc 96

Arg	Asp	Gly	Leu	Arg	Ala	Val	Met	Glu	Cys	Arg	Asn	Val	Thr	His	Leu	
20				25				30								
ctg	caa	caa	gag	ctg	acc	gag	gcc	cag	aag	ggc	ttt	cag	gat	gtg	gag	144
Leu	Gln	Gln	Glu	Leu	Thr	Glu	Ala	Gln	Lys	Gly	Phe	Gln	Asp	Val	Glu	
35				40				45								
gcc	cag	gcc	gcc	acc	tgc	aac	cac	act	gtg	atg	gcc	cta	atg	gct	tcc	192
Ala	Gln	Ala	Ala	Thr	Cys	Asn	His	Thr	Val	Met	Ala	Leu	Met	Ala	Ser	
50				55				60								
ctg	gat	gca	gag	aag	gcc	caa	gga	caa	aag	aaa	gtg	gag	gag	ctt	gag	240
Leu	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Gln	Gly	Gln	Lys	Lys	Val	Glu	Glu	Leu	Glu	
65				70				75				80				
gga	gag	atc	act	aca	tta	aac	cat	aag	ctt	cag	gac	gcg	tct	gca	gag	288
Gly	Glu	Ile	Thr	Thr	Leu	Asn	His	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Ser	Ala	Glu	
85				90				95								
gtg	gag	cga	ctg	aga	aga	gaa	aac	cag	gtc	tta	agc	gtg	aga	atc	gcg	336
Val	Glu	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Asn	Gln	Val	Leu	Ser	Val	Arg	Ile	Ala	
100				105				110								
gac	aag	aag	tac	tac	ccc	agc	tcc	cag	gac	tcc	agc	tcc	gct	gcg	gcg	384
Asp	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	
115				120				125								
ccc	cag	ctg	ctg	att	gtg	ctg	ctg	ggc	ctc	agc	gct	ctg	ctg	cag		429
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Gln		
130				135				140								

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 378

## <212> DNA

### <213> Artificial Sequence

<223> Nucleotide sequence coding for a fusion protein comprising HA

peptide and C-terminal- lacking soluble HM 1.24 antigenic protein

<400> 11

tac cca tac gac gtc cca gac tac gct ggt acc aac agc gag gcc tgc 48

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys

1 5 10 15

cgg gac ggc ctt cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc 96

Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu

20 25 30

ctg caa caa gag ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag 144

Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu

35 40 45

gcc cag gcc gcc acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc 192

Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser

50 55 60

ctg gat gca gag aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag 240

Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu

65 70 75 80

gga gag atc act aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag 288

Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu

85 90 95

gtg gag cga ctg aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg 336

Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala

100 105 110

gac aag aag tac tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct 378

Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala

115 120 125

<210> 12

<211> 379

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence coding for L chain V region version a of  
humamized anti-HM 1.24 antibody

&lt;400&gt; 12

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc tcc ttg gta gca aca gct aca ggt	48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc cac tcc gac atc cag atg acc cag agc cca agc agc ctg agc gcc	96
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala	
-1 1 5 10	
agc gtg ggt gac aga gtg acc atc acc tgt aag gct agt cag gat gtg	144
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val	
15 20 25	
aat act gct gta gcc tgg tac cag cag aag cca gga aag gct cca aag	192
Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	
30 35 40 45	
ctg ctg atc tac tcg gca tcc aac cgg tac act ggt gtg cca agc aga	240
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg	
50 55 60	
ttc agc ggt agc ggt agc ggt acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc	288
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser	
65 70 75	
ctc cag cca gag gac atc gct acc tac tac tgc cag caa cat tat agt	336
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser	
80 85 90	
act cca ttc acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa c	379

Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

<210> 13

<211> 418

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region version r of  
humanized anti-HM 1.24 antibody

<400> 13

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt 48

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15

-10

-5

gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1

1

5

10

cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15

20

25

act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30

35

40

45

gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt 240

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50

55

60

cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atg acc gca gac aag tcc acg agc 288

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65

70

75



aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95

100

105

tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g 418  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 418

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence coding for H chain V region version s of  
 humanized anti-HM 1.24 antibody

&lt;400&gt; 14

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc ttc ttg ctg gct gta gct cca ggt 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

-15

-10

-5

gct cac tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1

5

10

cct ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15

20

25

act ccc tac tgg atg cag tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30	35	40	45	
gag tgg atg gga tct att ttt cct gga gat ggt gat act agg tac agt				240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser				
	50	55	60	
cag aag ttc aag ggc aga gtc acc atc acc gca gac aag tcc acg agc				288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser				
	65	70	75	
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg				336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val				
	80	85	90	
tat tac tgt gcg aga gga tta cga cga ggg ggg tac tac ttt gac tac				384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr				
	95	100	105	
tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca g				418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
110	115	120		

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1014

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homosapiens

<223> Nucleotide sequence coding for humam HM 1.24 antigenic protein  
expressed on cell membrane

&lt;400&gt; 15

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc				49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys				
	1	5		
aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg				97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly				

10	15	20	25	
ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc gtg att ctg ggg gtg ccc ttg				145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu				
	30	35	40	
att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt				193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu				
	45	50	55	
cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag				241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu				
	60	65	70	
ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc				289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala				
	75	80	85	
acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag				337
Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu				
	90	95	100	105
aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act				385
Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile thr				
	110	115	120	
aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg				433
Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu				
	125	130	135	
aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac				481
Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr				
	140	145	150	
tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg				529
Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu				
	155	160	165	

att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tgagatccca ggaagctggc 582  
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln

170 175 180  
 acatcttgga aggtccgtcc tgctcggcctt ttcgcttgaa cattcccttg atctcatcag 642  
 ttctgagcgg gtcattggggc aacacgggta gcggggagag cacggggtag ccggagaagg 702  
 gcctctggag caggtctgga ggggccatgg ggcagtcctg ggtgtgggga cacagtcggg 762  
 ttgaccacagg gctgtctccc tccagagcct ccctccggac aatgagtccc ccctcttgctc 822  
 tcccaccctg agattgggca tgggggtgcgg tgtggggggc atgtgctgcc tgttgttatg 882  
 gggttttttt gcgggggggg ttgctttttt ctgggggtcct tgagctccaa aaaaataaac 942  
 acttcctttg agggagagca caccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaattc 1002  
 gggcggccgc ca 1014

<210> 16

<211> 132

<212> PRT

<213> Homosapiens

<223> Amino acid sequence of soluble HM 1.24 antigenic protein

<400> 16

Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg

1 5 10 15

Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly

20 25 30

Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met

35 40 45

Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys

50 55 60

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

65 70 75 80

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

85 90 95  
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
 100 105 110  
 Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser  
 115 120 125  
 Ala Leu Leu Gln  
 130  
 <210> 17  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homosapiens  
 <223> Amino acid sequence of extra cellular downing of C-terminal  
 lacking soluble HM 1.24 antigenic protein  
 <400> 17  
 Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg  
 1 5 10 15  
 Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly  
 20 25 30  
 Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met  
 35 40 45  
 Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys  
 50 55 60  
 Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu  
 85 90 95  
 Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
 100 105 110

Ser Ser Ala

115

<210> 18

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of a fusion protein comprising HA peptide and soluble HM 1.24 antigenic protein

<400> 18

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys

1 5 10 15

Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu

20 25 30

Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu

35 40 45

Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser

50 55 60

Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu

65 70 75 80

Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu

85 90 95

Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala

100 105 110

Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala

115 120 125

Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln

130 135 140

<210> 19

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of a fusion protein comprising HA peptide and C-terminal lacking soluble HM 1.24 antigenic protein

<400> 19

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr Asn Ser Glu Ala Cys

1 5 10 15

Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu

20 25 30

Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu

35 40 45

Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser

50 55 60

Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu

65 70 75 80

Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu

85 90 95

Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala

100 105 110

Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala

115 120 125

<210> 20

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of L chain V region version a of humanized  
anti-HM 1.24 antibody

&lt;400&gt; 20

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Ser Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-15

-10

-5

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

-1 1

5

10

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val

15

20

25

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

30

35

40

45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg

50

55

60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser

65

70

75

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser

80

85

90

Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Amino acid sequence of H chain V region version r of humanized  
anti-HM 1.24 antibody

&lt;400&gt; 21



Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
                           -15                          -10                          -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
                   -1   1                          5                          10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
           15                          20                          25

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
   30                          35                          40                          45

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
                           50                          55                          60

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
                           65                          70                          75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
           80                          85                          90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
           95                          100                          105

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
  110                          115                          120

<210> 22

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of H chain V region version s of humanized  
 anti-HM 1.24 antibody

<400> 22

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
                           -15                          -10                          -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

-1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

15 20 25

Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

30 35 40 45

Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser

50 55 60

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

<210> 23

<211> 180

<212> PRT

<213> Homosapiens

<223> Amino acid sequence of human HM 1.24 antigenic protein expressed  
on cell membrane

<400> 23

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly

1 5 10 15

Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu

20 25 30

Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala

35 40 45  
Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg  
50 55 60  
Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly  
65 70 75 80  
Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met  
85 90 95  
Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys  
100 105 110  
Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln  
115 120 125  
Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu  
130 135 140  
Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser  
145 150 155 160  
Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser  
165 170 175  
Ala Leu Leu Gln  
180

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02964

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P 21/02, G01N 33/53, G01N 33/531, G01N 33/543, C07K 16/28, A61K 39/395, C12N 15/12  
 // C12N 5/10, C12P 21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P 21/02, G01N 33/53, G01N 33/531, G01N 33/543, C07K 16/28, A61K 39/395, C12N 15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 REGISTRY (STN) , CA (STN) , MEDLINE (STN) , WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 99/43703, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK), 02 September, 1999 (02.09.99) & AU, 9926403, A & EP, 1059533, A1	1-20
X Y	WO, 98/14580, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK), 09 April, 1998 (09.04.98) & ZA, 9708865, A & JP, 10-155494 & AU, 9743992, A & NO, 9901591, A & EP, 960936, A1 & BR, 9712488, A & CN, 1235639, A & MX, 9903074, A1 & AU, 200019490, A & AU, 200069655, A & KR, 2000048884, A & HU, 9903317, A2 & CZ, 9901173, A3 & SK, 9900443, A3	17-18 9-16, 19-20
X Y	WO, 99/18212, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK), 15 April, 1999 (15.04.99) & AU, 9892830, A & EP, 1020522, A1 & NO, 200001671, A & BR, 9812846, A & CN, 1277632, A	17-18 9-16, 19-20
X	OZAKI, S. et al., "Humanized anti-HM1.24 antibody mediates	17-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
 09 May, 2001 (09.05.01)

Date of mailing of the international search report  
 22 May, 2001 (22.05.01)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02964

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells", Blood (1999), Vol.93, No.11, pp.3922-3930	9-16, 19-20
Y	WO, 95/10536, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK), 20 April, 1995 (20.04.95) & AU, 9478638, A & ZA, 9408016, A & JP, 7-196694 & EP, 733643, A1 & CN, 1135759, A & US, 5914252, A	1-20

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P 21/02, G01N 33/53, G01N 33/531, G01N 33/543, C07K 16/28, A61K 39/395, C12N 15/12  
// C12N 5/10, C12P 21/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P 21/02, G01N 33/53, G01N 33/531, G01N 33/543, C07K 16/28, A61K 39/395, C12N 15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 99/43703, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 2.9月.1999(02.09.99) & AU, 9926403, A & EP, 1059533, A1	1-20
X Y	WO, 98/14580, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 9.4月.1998(09.04.98) & ZA, 9708865, A & JP, 10-155494 & AU, 9743992, A & NO, 9901591, A & EP, 960936, A1 & BR, 9712488, A & CN, 1235639, A & MX, 9903074, A1 & AU, 200019490, A & AU, 200069655, A & KR, 2000048884, A & HU, 9903317, A2 & CZ, 9901173, A3 & SK, 9900443, A3	17-18 9-16, 19-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行、日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.05.01

国際調査報告の発送日

22.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO, 99/18212, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 15. 4月. 1999 (15. 04. 99) & AU, 9892830, A & EP, 1020522, A1 & NO, 200001671, A & BR, 9812846, A & CN, 1277632, A	<u>17-18</u> 9-16, 19-20
<u>X</u> Y	OZAKI, S. et al. "Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells", Blood(1999) Vol. 93, No. 11, p. 3922-3930	<u>17-18</u> 9-16, 19-20
Y	WO, 95/10536, A1 (CHUGAI SEIYAKU KK) 20. 4月. 1995 (20. 04. 95) & AU, 9478638, A & ZA, 9408016, A & JP, 7-196694 & EP, 733643, A1 & CN, 1135759, A & US, 5914252, A	1-20